

Aus dem Institut für Immunologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stefan Bauer
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Immunerkennung endogener RNA-Liganden

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Naturwissenschaften
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Stephanie Jung
aus Hachenburg



Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
30.09.2014

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Stefan Bauer

1.Koreferent: Prof. Dr. Friedemann Weber

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	5
1.1 Das Immunsystem.....	5
1.1.1 Die angeborene Immunität	6
1.2 Virusinfektionen und antiviraler Status.....	7
1.3 Typ I Interferone	8
1.4 Pattern recognition receptors.....	9
1.4.1 RIG I like receptors.....	9
1.4.2 Toll-like receptors	14
1.5 RNasen	16
1.5.1 2' 5' Oligoadenylat-Synthetase / RNase L System.....	17
1.5.2 RNase A-Superfamilie	20
1.5.3 Rnase III	22
1.6 Ribosomale RNA.....	22
1.7 Zielsetzung	24
2 Materialien	25
2.1 Chemikalien	25
2.2 Geräte	27
2.3 Puffer und Lösungen	28
2.4 Wachstumsmedien	32
2.4.1 Wachstumsmedien für Bakterien	32
2.4.1.1 Wachstumsmedien für Säugerzellen	32
2.5 Zellen	33
2.5.1 Prokaryotische Zellen	33
2.5.2 Zelllinien	33
2.5.3 Humane primäre Zellen	34
2.6 Mäuse	34
2.7 Stimulanzien.....	34
2.8 Transfektionsreagenzien	34
2.9 Verbrauchsmaterial	35
2.10 Nukleinsäuren und Nukleotide.....	36
2.10.1 Nukleinsäuren als Größenstandard	36
2.10.2 siRNAs	36
2.10.3 Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide	36
2.10.4 RNA-Oligonukleotide	37
2.10.5 DNA-Oligonukleotide (Primer).....	38
2.10.6 DNA-Oligonukleotide für in vitro Transkriptionen.....	40
2.10.7 RNase A-Konstrukte	41

2.10.8.	spezielle DNA-Oligonukleotide.....	42
2.11	Kits.....	42
2.12	Proteine.....	43
2.12.1	Enzyme	43
2.12.2	Antikörper	43
2.12.3	Zytokine.....	44
2.13	Vektoren und rekombinante Plasmide	44
2.14	Software	45
3	Methoden.....	46
3.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	46
3.1.1	Analyse von Nukleinsäure-Fragmenten (DNA- oder RNA-Fragmenten)	46
3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion	48
3.1.3	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	49
3.1.4	Reinigung von Nukleinsäuren.....	50
3.1.5	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	51
3.1.6	Transformation von Plasmiden in kompetente Zellen	53
3.1.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	54
3.1.8	RNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen.....	54
3.1.9	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	55
3.1.10	Quantitative PCR (qPCR)	56
3.2	Methoden zur Analyse und Modifikation von RNA.....	57
3.2.1	In vitro Transkription (IVT)	57
3.2.2	Hydrolyse von RNA mittels RNasen	57
3.2.3	Fragmentierung von RNA mittels Zinkhydrolyse	57
3.2.4	Fragmentierung von RNA mittels Bleihydrolyse	58
3.2.5	Fragmentierung von RNA mittels Ultraschall-Behandlung	58
3.2.6	5' Phosphorylierung von RNA mittels PNK	58
3.2.7	Dephosphorylierung von RNA mittels CIP	58
3.2.8	Auftrennung der RNA-Fragmente mittels NucleoBond RNA/ DNA 400 Säulen	59
3.2.9	Annealing komplementärer RNA-Fragmente	59
3.2.10	stem-loop qRT-PCR	60
3.2.11	Klonierung von RNA-Fragmenten unbekannter Sequenz mittels Adapterligation	61
3.2.12	Ion Torrent.....	63
3.2.13	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	63
3.3	Zellkultur.....	64
3.3.1	Kultivierung von murinen Makrophagen.....	65
3.3.2	Kultivierung von murinen mDCs	65

3.3.3	Kultivierung von murinen pDCs	65
3.3.4	Kultivierung humaner PBMCs	66
3.3.5	Isolation primärer humaner Immunzellen aus Buffy coats	66
3.3.6	Separation humaner Monozyten durch Elutriation	67
3.3.7	Immunstimulationen durch Nukleinsäuren mittels Lipofectamin2000	68
3.3.8	Immunstimulationen durch Nukleinsäuren mittels Dotap	70
3.3.9	NF-κB Reporterassay	70
3.3.10	Luciferaseassay	71
3.3.11	Transfektion von Proteinen mittels Saint-PhD	71
3.3.12	Proteintransfektion mittels Saint-PhD	71
3.3.13	MTT-Vitalitätsassay	72
3.3.14	RIG I und MDA-Abschaltung mittels siRNAs	72
3.4	Biochemische und immunologische Methoden	73
3.4.1	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	73
3.4.2	Durchflusszytometrie	75
3.5	Methoden zur Proteinproduktion und Analyse	76
3.5.1	Heterologe RNase A - Produktion in BL21 (E.coli)	76
3.5.2	Aufreinigung von RNase A aus Einschlusskörperchen	77
3.5.3	Aufreinigung von RNase A über Econo-Pac® 10DG Desalting Columns	77
3.5.4	BCA Protein Assay	78
3.5.5	Elektrophoretische Trennung von Proteinen (SDS-Gelelektrophorese)	78
3.5.6	Comassie-Färbung	79
3.5.7	Western Blot	79
3.5.8	Reinheitskontrolle über Zymogramme	80
3.6	Organentnahme	81
3.6.1	Organpräparation	81
4	Ergebnisse	83
4.1	Charakterisierung eines endogenen RIG I Liganden	83
4.1.1	Endogene doppelsträngige RNA führt zu einer spezifischen Immunstimulation	83
4.1.2	Produkte eines RNase A-Verdau fungieren als endogener RIG I Ligand	96
4.1.3	Identifikation des endogenen RIG I Ligandes	100
4.2	Untersuchungen zur intrazellulären immunstimulatorischen Aktivität von RNase A	115
4.2.1	Produktion rekombinanter RNase A und Verifikation ihrer immunstimulatorischen Aktivität	115
4.2.2	Die RNase A-vermittelte Immunstimulation hängt von der Enzymaktivität ab	116
4.2.3	RNase A generiert intrazellulär immunstimulatorische RNA-Fragmente	118

4.3	Charakterisierung eines spezifischen TLR8-Liganden	120
4.3.1	Immunstimulation durch verschiedene RNA63-Derivate in humanen PBMCs.....	120
4.3.2	Immunstimulation durch verschiedene RNA63-Derivate in murinen pDCs.....	122
4.3.3	Verifizierung der TLR8-Spezifität von RNA63 2'-methyl.....	123
5	Diskussion	125
5.1	Beschreibung und Charakterisierung endogener RIG I Liganden	125
5.1.1	Bestimmung des verantwortlichen Rezeptors	125
5.1.2	Sequenz und Struktur der eRLs.....	126
5.1.3	Intrazelluläre Generierung der eRLs	129
5.1.4	Modifikationen der eRLs	130
5.1.5	Evolutionäre Konservierung der eRLs	131
5.1.6	eRLs und Krebs.....	131
5.1.7	Ausblick.....	132
5.2	Immunstimulatorisches Potential intrazellulärer RNase A	134
5.2.1	Charakterisierung des immunstimulatorischen Potentials intrazellulärer RNase A	134
5.2.2	Hypothesen zur Verwendbarkeit von RNase A als Adjuvans	135
5.2.3	Ausblick.....	136
5.3	Umwandlung einer TLR7-aktivierenden RNA in einen spezifischen TLR8-Liganden durch 2'-O-Methylierung	137
5.3.1	Unmodifizierte und 2'-methylierte RNA63 induzieren unterschiedliche Zytokinschemata	137
5.3.2	2'-O-methylierte RNA63 ist ein spezifischer TLR8-Ligand	138
5.3.3	Ausblick.....	138
	Zusammenfassung	140
	Summary	142
	Literaturverzeichnis.....	143
	Abkürzungsverzeichnis	154
	Abbildungsverzeichnis	160
	Tabellenverzeichnis	161
	Verzeichnis der akademischen Lehrer	162
	Danksagung	163

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem stellt im weitesten Sinne einen Abwehrmechanismus gegen Schädigungen dar. Beim Prokaryoten kann dies über ein einfaches System wie z.B. durch Restriktionsendonukleasen zur Beseitigung von Fremd-DNA erfolgen. Beim Wirbeltier steht ein komplexes System zur Verfügung, das den Körper vor infektiösen Erregern, schädigenden Substanzen oder auch Zellen, die eine maligne Transformation durchlaufen haben, schützt (113). Auf anatomischer Ebene stehen beim Menschen primäre lymphatische Organe (Knochenmark, Thymus), in denen Immunzellen heranreifen, und sekundäre lymphatische Organe (Milz, Lymphknoten, Peyer-Plaques, Tonsillen und Appendix vermiformis), die eine zentrale Rolle in der Immunantwort spielen, zur Verfügung (157).

Die Immunantwort unterteilt sich in einen angeborenen (innate) und einen erworbenen (adaptiven) Teil, beide bestehen aus einer zellulären und einer humoralen Komponente (113). Die erworbene Immunantwort mit ihren spezifischeren Wirkmechanismen wird zusätzlich initiiert, wenn die angeborene Immunität nicht ausreicht, um eine Infektion einzudämmen. Die hierbei relevanten Effektorzellen gehören zu den Gruppen der B- und T-Lymphozyten, diese wurden nach ihren Reifungsorten benannt: Die B-Lymphozyten reifen in der Bursa Fabricii der Vögel und im Knochenmark (bone marrow) der Säugetiere heran (64). Die T-Lymphozyten werden zwar ebenfalls im Knochenmark gebildet, wandern allerdings zur Reifung in den Thymus aus (148). Die hohe Bandbreite der Rezeptorspezifität wird durch zufällige somatische Rekombination der einzelnen variablen Rezeptorgensegmente generiert. Hierbei entstehen Rezeptoren mit individueller Spezifität, die in ihrer Summe praktisch jedes Antigen erkennen können (115). Um Autoimmunität zu verhindern, werden T-Lymphozyten während ihrer Reifung im Thymus negativ selektioniert und solche mit Spezifität für körpereigene Antigene eliminiert (4). Bei Auslösung einer adaptiven Immunantwort binden die individuellen Rezeptoren der Lymphozyten an für sie spezifische Antigene, was zur Vermehrung dieser Lymphozyten und zur nachfolgenden Selektion ihrer Klone auf hochaffine Rezeptoren führt (113). Ein Teil dieser Effektorzellen differenziert im weiteren Verlauf zu Gedächtniszellen, die nach Impfung, bzw. bei sich wiederholender Infektion, rasch auf dasselbe Antigen reagieren können (62).

Nach der Bindung löslichen Antigens durch den Rezeptor der B-Zellen reifen diese zu Plasmazellen heran und produzieren zirkulierende Antikörper. Hierzu benötigen sie allerdings einen Stimulus durch die CD4-positiven T-Helferzellen; dieser Schritt stellt

einen zusätzlichen Schutzmechanismus gegen die Erkennung körpereigener Strukturen dar (47). Die Antigenerkennung durch T-Helferzellen beschränkt sich auf Peptide, die ihnen auf Antigen-präsentierenden Zellen („antigen presenting cells“, APCs) von Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“, MHC) II Molekülen präsentiert werden. Eine weitere Untergruppe der T-Lymphozyten sind die CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen, die virusinfizierte oder entartete Zellen abtöten, wenn diese ihnen ein spezifisches Antigen auf einem MHC I Molekül präsentieren (48).

1.1.1 Die angeborene Immunität

Die angeborene Immunität stellt die ältere Form der Immunabwehr dar und besteht aus verschiedenen Komponenten. Als erste Front der Immunabwehr dienen mechanische Faktoren wie beispielsweise ein durch Tight junctions verschlossenes Epithel oder die Schleimbewegung in der Lunge durch Cilien. Auch chemische Faktoren wie der niedrige pH-Wert im Magen oder die mikrobielle Komponente der Normalflora dienen der initialen Abwehr. Erst wenn einem Pathogen die Überwindung dieser Barrieren gelingt, kann es zu einer Infektion und zum Auslösen einer Immunantwort kommen.

Die ersten 96 Stunden einer Infektion werden durch die angeborene Immunantwort bestimmt. Deren Zellen (Monozyten / Makrophagen, Dendritische Zellen, Granulozyten, Mastzellen und natürliche Killerzellen) verfügen über ein Repertoire an Keimbahn-kodierten Rezeptoren („pattern recognition receptors“, PRRs). Diese ermöglichen die Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern („pathogen associated molecular patterns“, PAMPs), welche nicht in Säugerzellen vorkommen, aber spezifisch für viele Pathogene sein können. Eine solche Immunerkennung führt zur Produktion von Interleukinen (IL) sowie Interferonen (IFN) und schließlich zur Expression Interferon-stimulierter Gene (ISGs) (135).

Das Komplementsystem stellt die humorale Komponente des angeborenen Immunsystems dar. Zum einen erleichtert es durch Opsonisierung die Erkennung von Bakterien und führt weiterhin über einen lytischen Angriff auf deren Zellmembran zum Abtöten des Pathogens. Zum anderen werden während der kaskadenartigen Komplementaktivierung Entzündungsmediatoren und chemotaktische Faktoren freigesetzt (113).

Hier soll besonders auf die zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems eingegangen werden. Gewebemakrophagen und ihre Vorläuferzellen, im Blut zirkulierende Monozyten, weisen ebenso wie neutrophile Granulozyten

phagozytotische Aktivität auf, die zur Aufnahme und dem Abtöten von Bakterien führt (77). Außerdem gehören Monozyten bzw. Makrophagen der Gruppe professioneller antigen-präsentierender Zellen an, zu der außerdem konventionelle Dendritische Zellen („conventional dendritic cells“, cDCs) und B-Zellen gehören. Diese APCs verfügen über PRRs, mithilfe derer sie ein ingestiertes Pathogen anhand seiner PAMPs erkennen können. Dies führt zu einer Aktivierung der APCs, die sich in einer gerichteten Zytokin- und Chemokinsynthese, der Expression kostimulatorischer Oberflächenmarker und der Migration in sekundäre Immunorgane äußert (100). Dort erfolgt die Präsentation des Antigens an CD4 positive T-Zellen durch MHC II Moleküle und die Initiation der adaptiven Immunantwort. Es sollte allerdings erwähnt werden, dass die Fähigkeit zur Antigenpräsentation nicht auf APCs beschränkt ist, sondern auch somatische Zellen körpereigene Peptide auf ubiquitär exprimierten MHC I Molekülen präsentieren, welche dann von den zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen erkannt werden können (204). Auch exprimieren somatische Zellen selbst PRRs und können im Fall einer Virusinfektion über die Produktion von Typ I IFN und proinflammatorischen Zytokinen Warnsignale aussenden (78).

Dendritische Zellen werden in die oben beschriebenen cDCs und die plasmazytoiden Dendritischen Zellen („plasmacytoid dendritic cells“, pDCs) unterteilt. Die wichtigste Aufgabe der pDCs ist die Erkennung einer Virusinfektion. Durch die Expression der Toll-like Rezeptoren (TLR) 7 und 9 erkennen sie virale Nukleinsäuren, was zu einer starken IFN- α Produktion führt (34). Weiterhin sind noch Natürliche Killerzellen zu erwähnen, die zelluläre Stressmoleküle erkennen, sowie basophile und eosinophile Granulozyten, deren toxische Granula u.a. eine Rolle in der Parasitenabwehr spielen. Während die evolutionäre Funktion der Mastzellen auch in der Abwehr von Parasiten besteht, sind diese Zellen in der heutigen Zeit vor allem für die Ausbildung von Allergien verantwortlich (113).

1.2 Virusinfektionen und antiviraler Status

Viren sind infektiöse Partikel, die aus Proteinen, Nukleinsäuren und je nach Typ auch aus einer Lipidmembran bestehen. Ihre Einteilung erfolgt anhand der Nukleinsäuren in DNA und RNA-Viren mit einzelsträngigem („single stranded“, ss) oder doppelsträngigem („double stranded“, ds) Genom; außerdem wird zwischen plus- und minussträngigen-ssRNA-Genomen unterschieden. Viren besitzen keinen eigenen Stoffwechsel und sind somit obligat intrazelluläre Parasiten. Manche Viren werden nach Bindung an ihren spezifischen zellulären Rezeptor (Adsorption) ins Zellinnere (Penetration) aufgenommen, andere gelangen durch Verschmelzen ihrer Hüllmembran mit der Plasmamembran ins Zytoplasma. Endosomal vorliegende Viren werden im nachfolgenden Schritt ins Zytoplasma freigesetzt. Das virale Genom löst sich aus dem

Komplex umhüllender Capsidproteine (Uncoating), es folgt die Synthese viraler Proteine und Nukleinsäuren. Um ihre Replikation zu gewährleisten, steuern Viren zelluläre Prozesse um, was zum Zelltod, persistenter Infektion oder auch zur Transformation führen kann (201).

Um dies zu verhindern, exprimieren Zellen verschiedenste PRRs (1.4), welche eine Virusinfektion detektieren können. Die Erkennung einer Virusinfektion führt zur Produktion von Typ I IFN. Dieses führt nach Bindung an den IFN-Rezeptor durch Januskinase - Signal Transducers and Activators of Transcription (JAK-STAT) - Signalgebung zur Transkription der ISGs (vergleiche 1.3) und etabliert einen antiviralen Status in der Zielzelle, sowie in benachbarten Zellen. Die Zahl der ISGs wird in Abhängigkeit vom Zelltyp auf mehrere hundert Proteine geschätzt. Diese haben überlappende Funktionen, sodass der Ausfall einzelner ISGs kompensiert werden kann, was die zentrale Rolle dieser Proteine veranschaulicht. Für eine effektive Hemmwirkung ist die gleichzeitige Expression einer Vielzahl von ISGs erforderlich, weshalb die zelluläre Antwort auf ein Virus durch ein charakteristisches virusspezifisches ISG-Profil bestimmt ist (190, 191). Die einzelnen ISGs lösen verschiedene spezifische Effekte aus, wie die Blockade des Eintritts in die Wirtszelle, der Proteintranslation, der Genomreplikation und der Virusfreisetzung. (53). Die Mehrheit der ISGs wirkt hemmend auf die Virusreplikation, einzelne ISGs, wie z.B. Adenosine Deaminase Acting on RNA (ADAR), können sie aber auch verstärken (191).

Ein besonderer Mechanismus zur Etablierung eines antiviralen Status ist das 2' 5' Oligoadenylat-Synthetase / RNase L System, auf welches in 1.5.1 näher eingegangen wird.

1.3 Typ I Interferone

Typ I Interferone können von fast jeder Körperzelle in Folge einer PRR-Stimulation freigesetzt werden (208). Die Typ I IFN-vermittelte Signalweiterleitung wurde bereits ausführlich beschrieben: Typ I IFN ist der Ligand eines heterodimeren Rezeptors auf der Plasmamembran, der sich aus den beiden Ketten IFNAR1 und IFNAR2 zusammensetzt. Diese sind permanent mit Tyrosinkinase 2 (TYK2) und Januskinase 1 (JAK1) assoziiert, welche durch die Bindung von Typ I IFN an den Rezeptor aktiviert werden. In Folge dessen werden STAT-Protein 1 („Signal Transducer and Activators of Transcription 1“, STAT1) und STAT2 phosphoryliert, dimerisiert und in den Nukleus translokalisiert. Hier bilden sie gemeinsam mit dem interferon-regulierenden Faktor 9 („Interferon Regulatory Factor 9“, IRF9) einen als Interferon-stimulierten Genfaktor 3 („IFN-stimulated gene factor 3“, ISGF3) bezeichneten Komplex. Dieser bindet an der

IFN-stimulierte-Antwort-Element („IFN-Stimulated Response Element“, ISRE) in der Promotorregion der ISGs (51, 128, 129, 208). Dies führt sowohl in der infizierten Zelle selbst als auch in den Nachbarzellen zur Etablierung eines antiviralen Status (vergleiche 1.2). Außerdem lenken Typ I IFNs die angeborene Immunität in Richtung Virusabwehr, hemmen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und somit die Immunantwort auf Bakterien. Weiterhin sorgen sie für eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems (99).

1.4 Pattern recognition receptors

Die PRRs dienen den Zellen der angeborenen Immunantwort zur Identifikation von PAMPs. Bei diesen kann es sich sowohl um Moleküle handeln, die nur in Pathogenen vorkommen, als auch um bestimmte Nukleinsäure-Abfolgen, -Modifikationen oder -Strukturen. Eine Aktivierung der PRRs führt zur Produktion von Typ I IFN, proinflammatorischen Zytokinen oder auch zur Aktivierung des Inflammasoms. Außerdem erfolgt eine Mobilisierung der angeborenen Immunantwort durch erhöhte MHCII Expression und eine Induktion der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 (205).

1.4.1 RIG I like receptors

Die Familie der RIG I like receptors (RLRs) nimmt bei der Erkennung von Virusinfektionen durch die zytoplasmatische Detektion viraler Genome, Transkripte und Replikationsintermediate eine zentrale Rolle ein (174).

Ihre drei Mitglieder Retinoic Acid Inducible Gene I (RIG I), Melanoma Differentiation-Associated Antigen 5 (MDA5) und Laboratory of Genetics and Physiology 2 (LGP2) gehen auf ein gemeinsames Vorläufergen zurück und sind unter Wirbeltieren konserviert (230). Während RIG I und MDA5 zur Erkennung unterschiedlicher viraler RNAs und nachfolgender Signalgebung befähigt sind, ist LGP2 daran nur indirekt beteiligt.

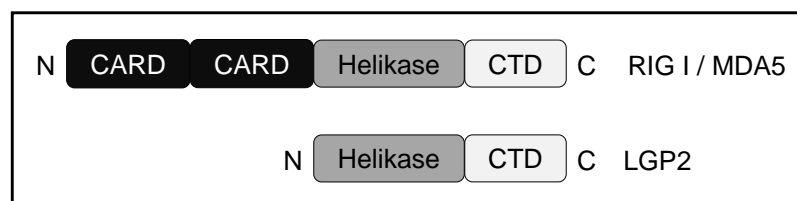


Abbildung 1: Grundstruktur der RLRs.

Farbliche Darstellung: CARD-Domänen in schwarz, Helikase-Domänen in dunkelgrau, C-terminale Domänen in hellgrau. N = N-Terminus, C = C-Terminus

Der Grundbauplan der RLRs besteht aus einer C-terminalen Domäne (CTD) und einer zentralen DExD/H Box RNA-Helikase-Domäne, die ATP hydrolysieren, RNA binden

und diese dann entwinden kann. Das Zusammenspiel beider Strukturen ermöglicht die Erkennung von RNA. RIG I und MDA5 enthalten außerdem zwei N-terminale Caspase Activation and Recruitment Domains (CARDs), die bei LGP2 fehlen und für das Auslösen einer nachgeschalteten Signalkaskade zuständig sind (siehe Abbildung 1) (222).

1.4.1.1 RLR-vermittelte Signaltransduktion und Zytokinantwort

Bei Ligandenerkennung werden RIG I und MDA5 aktiviert und zu Homooligomeren zusammengelagert, sodass sie über CARD-CARD Interaktionen mit dem nachfolgenden Adapterprotein Mitochondrial Antiviral Signaling Protein (MAVS, auch als VISA, IPS-1 oder CARDIF bezeichnet) interagieren. Dieses ist auf der äußeren mitochondrialen und peroxisomalen Membran lokalisiert (56, 193, 205) und bildet in seiner aktivierten Form prionenähnliche Aggregate (96). An dieser Stelle gabelt sich die Signalgebung in die proinflammatorische und die Typ I Interferon-Antwort auf (vergleiche auch Abbildung 2):

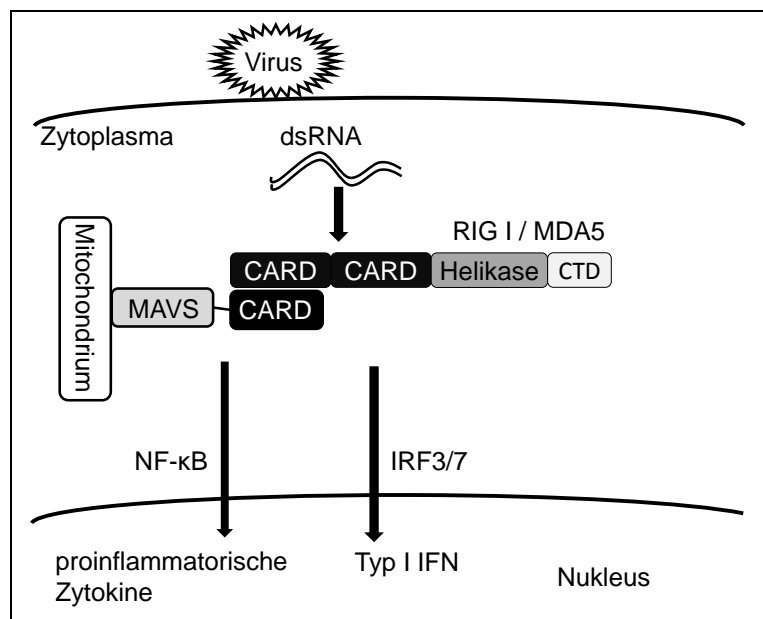


Abbildung 2: Schematische Darstellung der RLR Signalgebung.

Farbliche Darstellung: Das Mitochondrium ist in weiß, MAVS in mittelgrau, CARD in schwarz, die Helikase-Domäne in dunkelgrau und die CTD in hellgrau dargestellt. Pfeile deuten eine Aktivierung bzw. eine Signalgebung an.

MAVS dient zum einen als Plattform für einen Komplex, der unter anderem TANK-Binding Kinase 1 (TBK1) und IκB Kinase ε (Ikk ε) enthält. Dieser Komplex führt schließlich zur Phosphorylierung und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Interferon-regulierender Faktor 3 („Interferon Regulatory Factor 3“, IRF3) und IRF7, die als Homo- und Heterodimere Typ I IFN induzieren (132, 158, 169). IFN-β wird sekretiert und bindet autokrin und parakrin an den IFN Rezeptor. Dieser leitet das Signal über den

JAK-STAT-Signalweg zum Zellkern und somit die Transkription der ISGs ein. Während IRF3 konstitutiv exprimiert wird, ist IRF7 selbst ein ISG und wird in einer positiven Feedback-Schleife hochreguliert (141, 182). Auch die in ruhenden Zellen geringe Expression der RLR selbst wird nach Virusinfektion oder Interferon-Behandlung stark hochreguliert, was zu einer verstärkten Signalgebung führt (107, 221). Die Transkription der proinflammatorischen Zytokine als zweiten Weg wird über die Phosphorylierung des NF- κ B Inhibitors und die nachfolgende nukleäre Translokation von NF- κ B vermittelt (132, 168, 225). Die nachfolgende Aktivierung von pro-IL1 β erfolgt MAVS-unabhängig über eine Interaktion zwischen RIG I und Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain (ASC). Letzteres führt zur Bildung eines Cysteiny-Aspartate Specific Protease 1 (Caspase 1) abhängigen Inflammasoms, welches pro-IL1 β zu aktivem IL1 β spaltet (164). Zudem kann die Erkennung viraler RNA durch RIG I zum Zelltod führen. Hierbei erfüllt IRF3 eine zweite Funktion neben seiner Aktivität als Transkriptionsfaktor: Es interagiert mit Bcl-2-associated X protein (Bax) und löst auf dem intrinsischen Weg Apoptose aus, um die virale Replikation einzudämmen (35, 36, 161).

1.4.1.2 Regulation der RLR-Signalgebung

Um eine überschießende Immunantwort zu verhindern, muss die RLR-Signalweiterleitung streng reguliert werden. Für RIG I ist bekannt, dass dies unter anderem durch eine autoinhibitorische Funktion geschieht: Hierbei interagieren im ligandenfreien Stadium bestimmte CARD-Regionen mit bestimmten Helikase-Regionen. Somit stehen die CARD-Domänen für eine Signalgebung nicht zur Verfügung (117).

Weiterhin erfolgt die Regulation der RLR-Signalgebung durch verschiedene postrtranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen, Acetylierungen und SUMOylierungen der Signalkomponenten; eine besonders zentrale Rolle spielen allerdings Ubiquitinierungen und Deubiquitinierungen (132). Die Ubiquitin-Ligase RING finger protein leading to RIG I activation (Riplet) ist essentiell für eine virusinduzierte Immunantwort und vermittelt die Lysin 63 verknüpfte (Lys63) Ubiquitinierung der Lysine 154, 164 und 172 in den CARDS und der Lysine 849, 851, 888, 907 und 909 in der RD von RIG I, was die CARD-CARD Interaktion zwischen RIG I und MAVS stabilisiert (72, 154, 155). Cylindromatosis (CYLD) deubiquitiniert RIG I, TBK1 und I κ B ϵ , hemmt so die IRF3 Signalgebung und schwächt den antiviralen Status ab (68). Auch die Ubiquitinligase Tripartite motif-containing protein 25 (TRIM25) ubiquitiniert RIG I an Lys172 (71). Außerdem vermittelt TRIM25 nach Zusammenbau des MAVS-assoziierten Kinasekomplexes eine Lys48-Ubiquitinierung von MAVS. Dies führt zum Abbau von MAVS, wodurch der Kinasekomplex ins Cytoplasma freigesetzt wird, und

ermöglicht somit die Phosphorylierung von IRF3 (30). Über die Regulation der MDA5-Signalgebung ist weniger bekannt. Die Aminosäure Lys172 ist in MDA5 nicht konserviert, weshalb MDA5 nicht wie RIG I über eine TRIM25-vermittelte Ubiquitinierung reguliert wird (71). Allerdings ist es für eine IRF3-Aktivierung durch MDA5 essentiell, dass die CARD-Domänen des MDA5-Moleküls an Lys63 verknüpfte Ubiquitinketten binden (101).

Eine negative Feedback-Schleife tritt durch die IFN- α vermittelte Hochregulation der Lys48-Ubiquitin-Ligase Homo Sapiens Ring-Finger Protein 125 (RNF 125) in Kraft, die den Abbau von RIG I, MDA5 und MAVS im Proteasom einleitet (13). Ebenfalls durch Typ I IFN wird eine verkürzte Splicevariante des RIG I hochreguliert, deren CARDS nicht ubiquitiniert werden können und die durch Interaktion mit der wt-Variante deren Interaktion mit MAVS hemmt (70).

Neuste Forschungsergebnisse deuten an, dass auch miRNAs eine Rolle bei der RLR-Regulation spielen, indem sie Moleküle der RLR-Signalkaskade oder direkt die IFN- α -Expression herunterregulieren (130).

1.4.1.3 Unterschiede zwischen den RLRs

Obwohl sowohl RIG I als auch MDA5 für die Erkennung viraler dsRNA im Zytoplasma verantwortlich sind, weisen sie Unterschiede in ihrer Ligandenspezifität auf. In Experimenten mit synthetischer dsRNA aus Inosine-Cytosine Polynucleotiden (Poly I:C) stellte sich heraus, dass RIG I kürzere und MDA5 längere RNA-Fragmente bevorzugt (110). Dies bedingt auch die Diversität in der RLR-vermittelten Viruserkennung. RIG I nimmt eine essentielle Rolle bei der Erkennung von Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae, Filoviridae, Arenaviridae, Bunyaviridae und über Polymerase III Transkripte auch bei der Detektion verschiedener DNA-Viren ein (vergleiche 1.4.1.4) (80, 109, 111, 163, 180). Insbesondere werden stark verkürzte Genome aus Defective Interfering (DI) Partikeln bevorzugt erkannt (19). MDA5 erkennt verschiedene Picornaviren und das Vacciniavirus (111, 162); verschiedene Flaviviridae und Reoviridae werden sowohl von RIG I als auch von MDA5 erkannt (110, 111).

Auf molekularer Ebene lässt sich vor allem in der RNA-Bindung durch die CTD ein entscheidender Unterschied zwischen RIG I und MDA5 erkennen: Wenn RIG I keine RNA gebunden hat, liegt das Molekül in offener Konformation vor, die CTD ist frei und kann mit potentiellen Liganden interagieren. Um 5'ppp und dsRNA zu erkennen, schließt die RIG I CTD eine enge Kappe um das Ende der dsRNA. Durch eine Konformationsänderung wird die RNA auch an die Helikase herangeführt und von ihr

gebunden; dies wird als die geschlossene Konformation bezeichnet. Infolgedessen wird der autoinhibitorische Status des RIG I Molekül aufgehoben, die CARDS werden frei und somit eine Interaktion mit Adapterproteinen und eine nachfolgende Signaltransduktion ermöglicht (117). Im MDA5 Molekül hingegen bindet die CTD nicht an das Ende der dsRNA, hier erfolgt die Nukleinsäuredetektion durch Anlagerung der CTD-Oberfläche an den dsRNA-Strang (219). Strukturanalysen zeigen, dass MDA5 sich in einem offenen Ring um die dsRNA legt und ATP-sensitive „Kopf-zu-Schwanz“-Filamente bildet, deren Grundstruktur das Dimer ist (160, 219). Da MDA5 leichter von kurzen als von langen dsRNA Fragmenten dissoziiert, werden längere dsRNA Fragmente stabiler gebunden und können somit von kürzeren Fragmenten unterschieden werden (159).

1.4.1.4 Besonderheiten von RIG I

RIG I ist ein Molekül von 925 AS Länge und einem Molekulargewicht von 102 kDa (169). Das zytoplasmatische Protein interagiert über seine CARDS mit kortikalem Aktin und ist somit in Membranrübchen angereichert (150). Es wurde erstmals als dsRNA-bindendes Protein, das nach Virusinfektion oder Poly I:C Stimulation zur Typ I IFN-Induktion führt, beschrieben (221) und kann RNA mit einer Länge von ungefähr 20 bp bis 1 kb binden (110, 143). Obwohl 5'ppp-dsRNA mit glatten Enden und ohne Fehlpaarungen in der Nähe dieses Endes als ultimativer RIG I Ligand bezeichnet wird, wird die Struktur der RIG I Liganden bis heute kontrovers diskutiert. Es existieren verschiedene Modelle zu Phosphorylierungsmuster, Doppel- oder Einzelsträngigkeit, Länge, Sekundärstruktur und der Beschaffenheit der Enden (117, 185, 186), auf die in 5.1 näher eingegangen wird.

RIG I nimmt nicht nur eine Rolle in der Erkennung von RNA-Viren, sondern auch in der Erkennung von DNA-Viren ein: Die RNA-Polymerase III transkribiert zytoplasmatische DNA zu doppelsträngiger 5'ppp RNA, welche dann über RIG I erkannt wird und zu einer IFN- β Induktion führt (3, 40). Auf diese Weise detektiert RIG I sogar die Infektion mit Bakterien und DNA-Viren, was die zentrale Rolle dieses Rezeptors in der angeborenen Immunität veranschaulicht.

	Erkennungsmuster	Virus
5' ppp	Capping viraler mRNAs durch virale Enzyme	Poxviren, Rotaviren (26)
	Dephosphorylierung zu 5'p	Bornaviren (80)
	kovalente Verknüpfung mit VPg-Protein	Picornaviren (66)
dsRNA	Abschirmung von PRR-Bindung durch Sequestrierung	Vacciniavirus, Ebolavirus, HIV, Influenza (26)

vRNA	Inhibition TRIM25-vermittelter Ubiquitinierung	Influenza (69, 146)
	MAVS - Degradation	Hepatitis A und C Viren (26)

Tabelle 1: Virus-vermittelte Hemmung der RIG I Signalgebung.

Um der Detektion durch RIG I zu entgehen, haben Viren vielfältige Mechanismen entwickelt, die in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt sind.

1.4.1.5 Besonderheiten von MDA5

Die RNA-Helikase MDA5 hat eine Länge von 1025 AS und ein Molekulargewicht von 117 kDa (169). Sie detektiert dsRNA von etwa 1-7 kb Länge, unabhängig von deren 5' Phosphorylierung (110). Pichlmair *et al.* (162) berichteten, dass MDA5 nicht einfach nur lange dsRNA erkennt, sondern ein komplexes Netz, das sich aus Einzel- und Doppelstrangbereichen verschiedener RNA-Stränge zusammensetzt. Zelleigene mRNA hemmt anhand der 2' O-Methylierung ihrer Cap-Struktur die Erkennung durch MDA5, sodass es nicht zu einer Signalgebung kommt. Diesen Mechanismus nutzen Coronaviren aus: Sie kodieren eine viruseigene Methyltransferase, um ihre eigene mRNA als zelleigen zu tarnen und so der Erkennung durch MDA5 und der Replikationsinhibition durch IFN- β zu entgehen (231).

1.4.1.6 Besonderheiten von LGP2

LGP2 ist 678 AS lang und 75 kDa groß (169). Zuerst wurde anhand von Überexpressionsstudien und siRNA-Knockdowns vermutet, dass LGP2 die Rolle eines Feedbackinhibitors der beiden signalgebenden RLRs RIG I und MDA5 spielt (118). Allerdings wiesen LGP2-Knockout Mäuse zwar eine höhere Sensitivität auf Poly I:C und eine höhere Resistenz gegenüber dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) auf, ihre Typ I IFN-Produktion und Überlebensrate nach Infektion mit dem Encephalomyocarditis Virus (ECMV) war aber herabgesetzt (212). Satoh *et al.* (183) zeigten, dass LGP2 für die RIG I und MDA5 vermittelte antivirale Antwort unverzichtbar ist und vermuteten, dass es beim uncoating der Ribonukleoproteine (RNPs) hilft. Auch bei der Erkennung von RNA-Polymerase III (Pol III)-Transkripten, über die RIG I eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* und Vaccinia-Virus detektiert, spielt LGP2 eine unterstützende Rolle (165). Physiologische Mengen LGP2 helfen bei der Detektion von Poly I:C durch MDA5, nicht aber durch RIG I (39). Folglich handelt es sich bei LGP2 nach dem heutigen Stand der Forschung nicht um einen inhibitorischen, sondern um einen akzessorischen Rezeptor.

1.4.2 Toll-like receptors

Nach der Entdeckung des Toll-Proteins der *Drosophila melanogaster* (9), welches angeborene Immunreaktionen im adulten Tier vermittelt, konnten menschliche

Homologe nachgewiesen werden (145, 175). Dies hatte die Benennung in Toll-ähnliche Rezeptoren („Toll-like receptors“, TLRs) zur Folge. TLRs sind Typ I-Transmembranproteine und sowohl in Insekten als auch in Vertebraten evolutionär konserviert (18, 214). Die extrazelluläre Domäne der TLRs besteht aus 19-25 leucinreichen Wiederholungseinheiten („Leucine-rich repeats“, LRRs), bildet eine hufeisenförmige Struktur und erkennt spezifische PAMPs. Bei Bindung eines solchen spezifischen Liganden kommt es zur Homo- bzw. Heterodimerisierung der TLRs und zur Signalweiterleitung. Für diese Weiterleitung ist die intrazelluläre Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne verantwortlich, welche an Adaptermoleküle bindet und somit eine Signalkaskade aktiviert (5, 102). Dies führt letztendlich sowohl zu einer proinflammatorischen als auch zu einer Typ I-IFN-Antwort (17).

Die Familie der TLRs nimmt aufgrund der unterschiedlichen Lokalisationen und des breiten Ligandenspektrums ihrer Mitglieder eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunität ein. Auch verhindert beispielsweise das Zusammenspiel der TLRs 3, 7 und 9 die Expression endogener Retroviren (223). Die spezifischen Eigenschaften dieser PRRs sind in Tabelle 2 dargestellt:

TLR	Lokalisation	Ligand
TLR1/2	Zelloberfläche	Triacyl-Lipopeptide
TLR2	Zelloberfläche	atypische Lipopolysaccharide, Lipoprotein / Lipopeptide, Lipoteichonsäure, Lipoarabinomannan, Glycoinositol-Phospholipide, Glycolipide, Hämagglutinin Porine, Hitzeschockprotein 70, Peptidoglycan, Phenol-lösliches Modulin, Zymosan
TLR3	Endosomen	ssRNA und dsRNA (Virus), Poly I:C
TLR4	Zelloberfläche	Lipopolysaccharide, Fusionsprotein des respiratorischen Synzytial Virus, Hüllprotein des murinen Mammatumorvirus, Hitzeschockproteine 60 und 70, Mannan
TLR5	Zelloberfläche	Bakterielles Flagellin
TLR6/2	Zelloberfläche	Diacyl-Lipopeptide, Lipoteichonsäure, Zymosan
TLR7	Endosomen	ssRNA (Virus), RNA40, Imiquimod, Resiquimod (R848), Loxoribine, Bropirimine
TLR8 (human)	Endosomen	ssRNA (Virus), RNA40, Imiquimod, Resiquimod (R848)
TLR9	Endosomen	dsDNA (Virus), bakterielle und virale CpG-Motive, Malaria – Hemozoin
TLR10 (human)	Zelloberfläche	nicht identifiziert, spielt vermutlich Rolle bei Abwehr von <i>Listeria monocytogenes</i> und Influenza
TLR11 (murin)	Endosomen	Uropathogene Bakterien, Profilin-ähnliches Molekül von <i>Toxoplasma gondii</i>

TLR12 (murin)	Endosomen	nicht identifiziert, spielt vermutlich Rolle bei Abwehr von <i>Toxoplasma gondii</i>
TLR13 (murin)	Endosomen	bakterielle RNA, VSV

Tabelle 2: Lokalisation und Liganden der TLRs (2, 73, 121, 124, 153, 173).

Besonderes Augenmerk soll an dieser Stelle den Gemeinsamkeiten und Unterschieden zwischen TLR7 und TLR8 gelten:

Während eine Expression der TLR7-mRNA in pDCs, B-Zellen und zu einem geringen Maß auch in Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen nachgewiesen werden konnte, fand sich nur in Monozyten eine signifikante TLR8-mRNA-Expression. In pDCs konnte keinerlei TLR8-mRNA detektiert werden (95). Untersuchungen zur Spezifität des TLR8 werden dadurch erschwert, dass der murine TLR8 nicht auf alleinige Stimulation mit dem TLR7/8 Agonisten R848 reagiert, weshalb postuliert wurde, dass er nicht funktional ist (106). Allerdings lässt sich bei Kostimulation mit TLR8-Agonisten und einem Poly T-Phosphothioat-Oligo (Poly T-PTO) sehr wohl eine Aktivierung des murinen TLR8 erzielen (76).

Unterschiede zwischen TLR7 und TLR8 zeigen sich auch in den von ihnen induzierten Zytokinschema. Während TLR7 sowohl eine proinflammatorische als auch eine Typ I-IFN-Antwort induziert, führt eine TLR8-Aktivierung über NF- κ B lediglich zur Produktion proinflammatorischer Zytokine (74, 90).

Modifikationen des Riboserückrades wie beispielsweise 2'-O-Ribose Methylierungen wirken hemmend (55). Während ein synthetischer 18S-rRNA Abkömmling (RNA63) zur IFN- α Freisetzung aus murinen pDCs führt, besitzt dessen methylierte Version antagonistische Eigenschaften (18). Eine solche 2' O-Methylierung verhindert nicht nur eine TLR7-Aktivierung durch den methylierten Strang selbst, sondern auch durch kotranskribierte nicht methylierte RNA-Stränge (84, 103, 206).

1.5 RNasen

RNasen nehmen in der angeborenen Immunität unterschiedlichste Funktionen ein. Sie können nach Induktion über TLRs die Expression bestimmter Zytokine herunterregulieren (210), zytotoxisch auf Lymphozyten oder Tumore wirken (133) oder indirekt über microRNAs auf anti- und proinflammatorische Prozesse und die Entwicklung von Lymphozyten einwirken (216, 229). Es existieren sowohl ssRNA als auch dsRNA spezifische RNasen. Weiterhin unterscheiden sich diese Enzyme in den Nukleotidsequenzen ihrer Schnittstellen (1) und in den Phosphorylierungsmustern ihrer

Produkte (167, 216). Im folgenden Kapitel werden RNasen mit zentralen Rollen in der angeborenen Immunität beschrieben.

1.5.1 2' 5' Oligoadenylat-Synthetase / RNase L System

Das 2' 5' Oligoadenylat-Synthetase / RNase L System trägt zum antiviralen Status in der Zelle bei. Hierbei wird die Oligoadenylat-Synthetase (OAS) durch die Bindung von viraler RNA stimuliert, woraufhin sie ATP zu 2'5' Oligoadenylat (2-5 A, siehe Abbildung 3) polymerisiert. Die einzige bisher bekannte Funktion von 2-5 A ist die Aktivierung der RNase L (vergleiche Abbildung 4) (22, 228), die als einzelstrangspezifische RNase sowohl zelluläre als auch virale RNA sequenzspezifisch schneidet (33).

Die OAS-Genfamilie ist auf Chromosom 12 lokalisiert und besteht aus vier Genen, OAS1, OAS2, OAS3 und OAS like protein (OASL), letzteres besitzt keine 2'5' OAS-Aktivität (170). Durch alternatives Splicing wird die Zahl der verschiedenen Isoformen auf 11 erhöht: OAS1 kodiert fünf Isoformen (p42, p44, p46, p48 und p52), das OAS2-Gen liefert die Information für zwei Proteine (p69 und p71), die OAS3-mRNA wird nur auf eine Art gespleißt und führt zur Expression des Proteins p100, und OASL kodiert drei Isoformen (p30, p45 und p59) (25, 79, 89, 171). Die Synthese der OAS-Proteine wird in Folge einer Virusinfektion durch Typ I IFN über IRF1 induziert (20), ihre Aktivierung erfolgt durch die Bindung von dsRNA (52, 142) oder Haarnadel-Strukturen wie z.B. der HIV-1 TAR RNA (138). Dies führt zur Oligomerisierung der OAS, welche dann ATP polymerisieren und daraus 2-5 A Oligomere (OAS1 und OAS2) bzw. 2-5 A Dimere (OAS3) generieren (170). Eine weitere Unterscheidung zwischen körpereigener und Fremd-RNA, außer über Doppel- und Einzelsträngigkeit, wird durch Nukleosid-Modifikationen gewährleistet, die während der Reifung zellulärer RNA posttranskriptionell eingefügt werden. So aktiviert z.B. Pseudouridin-haltige RNA die OAS weniger (8).

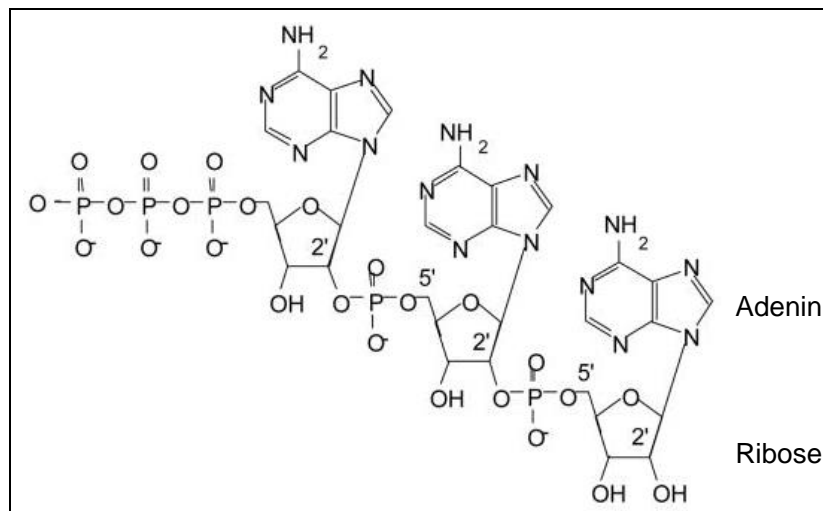


Abbildung 3: 5' ppp-Oligoadenylat (modifiziert aus (22)).

Um die RNase L aktivieren zu können, muss das 2-5A aus einem Gerüst von mindestens drei Adenyl-Resten bestehen und ein 5' Monophosphat oder 5' Triphosphat tragen, was den zellulären Gegenspielern der 2'5' OAS verschiedene Angriffspunkte bietet. Da ohne 5' Phosphorylgruppe die RNase L-Aktivität um mehr als ein 100-faches reduziert ist (58), ist eine Inhibition über 2-5 A Dephosphorylierung möglich (22). Außerdem wird 2-5 A durch eine zelluläre 2' Phosphodiesterase (2'-PDE) degradiert und das 2' 5' Oligoadenylat-Synthetase / RNase L System auf diese Weise gehemmt (120),

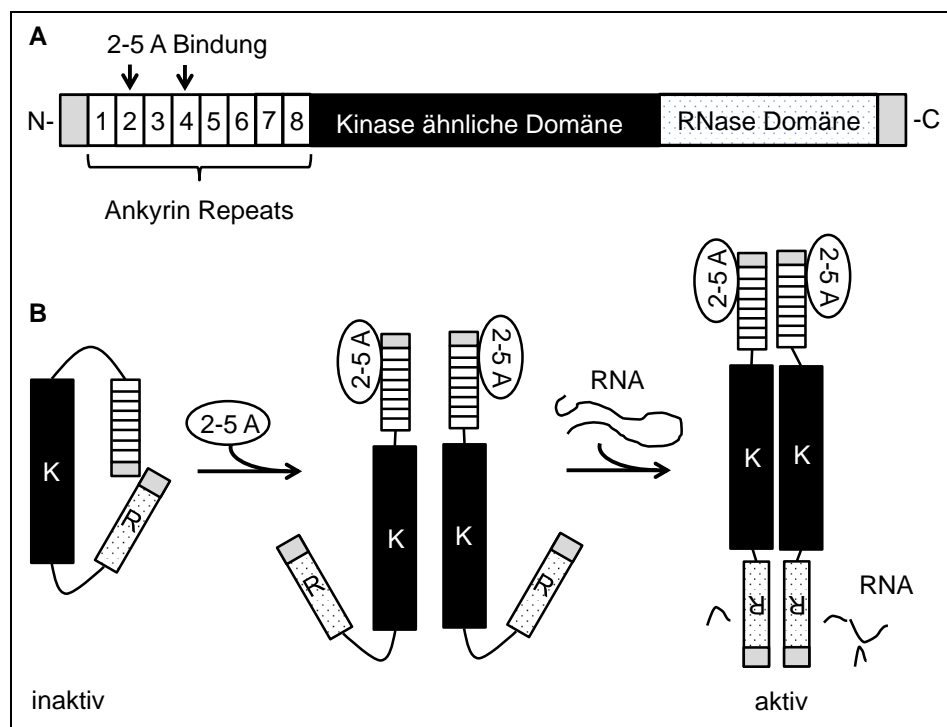


Abbildung 4: Aktivierung und Primärstruktur der RNase L.

Schematische Darstellung der RNase L Primärstruktur und Aktivierung. Die Ankyrin Repeats sind weiß, die Kinase-ähnliche Domäne ist schwarz und die RNase-Domäne gepunktet dargestellt. **A) Primärstruktur.** **B) Schematische Darstellung der RNase L Dimerisierung und Aktivierung.**

Das Effektorprotein dieses antiviralen Systems, die RNase L (L = latent), ist ein ubiquitär in Säugerzellen exprimiertes Enzym von 741 AS Länge und einem Molekulargewicht von 83,5 kDa (227). Es benötigt für seine Aktivierung 2-5 A und kann sich je nach Zellzyklus sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus befinden (6, 227). In inaktiver Form liegt das Enzym in geschlossener Konformation als Monomer vor. Durch Bindung von 2-5 A an die N-terminalen Ankyrin-Repeats 2 und 4 geht die RNase in eine offene Konformation über, lagert sich zu einem aktiven Homodimer zusammen, und die C-terminale katalytische Domäne wird zugänglich (57, 203). Um eine überschießende Aktivierung der RNase L zu verhindern, bindet der RNase L Inhibitor (RLI) an die RNase und verhindert so eine Interaktion mit aktivierendem 2-5 A (21).

RNase L schneidet RNA ausschließlich in Einzelstrangbereichen preferentiell am 3'Ende einer UU oder UA-Sequenz. Allerdings sind zudem Schnittstellen nach UG und UC Nukleotiden bekannt. Mit geringerer Wahrscheinlichkeit treten aber auch nach anderen Sequenzen Schnittstellen auf. Die entstehenden Produkte tragen eine 5' OH-Gruppe und ein 3' Monophosphat (67, 218).

Der enzymatische Abbau körpereigener RNA durch RNase L spielt eine wichtige Rolle in der Einleitung der Apoptose (131). Auch während Entwicklungsprozessen spielt RNase L eine wichtige Rolle. RNase L defiziente Mäuse weisen neben einer reduzierten antiviralen Antwort auch dramatische Defekte in der Apoptose, stark vergrößerte Thymi und erhöhte Thymozytenzahlen auf (228). Weiterhin konnten bei Patienten mit erblichem Prostatakarzinom („hereditary prostate cancer 1“, HCP1) gehäuft Mutationen im RNase L Gen nachgewiesen werden (29). Ähnliches wird für Patienten mit Brustkrebs berichtet (152).

Der antivirale Effekt der RNase L wird auf verschiedenste Weisen vermittelt. Durch Schneiden des ssRNA-Genoms wird die Virus-Replikation, wie z.B. des Encephalomyocarditis-Virus (EMCV), verhindert (196). Weiterhin führt RNase L während einer Virusinfektion über c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und Proteinkinase R (PKR) zur Autophagie infizierter Zellen und somit zur Beseitigung der Viruspartikel (32, 195). Ein besonderes Augenmerk ist auch auf die RNase L-vermittelte Spaltung ribosomaler RNA zu richten. Auf diesem Weg wird die zelleigene Translationsmaschinerie gehemmt und steht dem Virus nicht mehr zur Verfügung (197, 217).

Malathi *et al.* (139) berichteten erstmals von einer positiven Feedback-Schleife zur Generierung endogener und viraler RLR-Liganden (vergleiche Abbildung 5). Virale dsRNA wird nicht nur direkt von RIG I und MDA5 erkannt, sondern wie oben beschrieben auch von der OAS. Die durch OAS vermittelte 2-5 A-abhängige RNase L-Aktivierung führt zum Schneiden der nicht stimulatorischen, zelleigenen RNA in kleinere RNase L resistente dsRNA-Fragmente, unter denen sich ein stimulatorischer endogener RLR-Ligand befindet. Dieser konnte ebenfalls über MDA5 und RIG I erkannt werden und sorgt so für eine Amplifikation des Gefahrensignals durch virale dsRNA. Bislang konnten weder der Rezeptor selbst, noch die Sequenz des endogenen RLR-Liganden ermittelt werden.

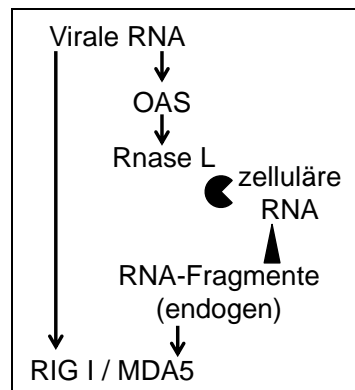


Abbildung 5: Schematische Darstellung des 2-5 A / RNase L Systems.

Bedeutung der Symbole: Pfeile deuten eine Aktivierung, Pacman das Zerschneiden der RNA und die Pyramide das Entstehen kleinerer RNA-Fragmente aus größeren an.

Da der 2' 5' Oligoadenylat-Synthetase / RNase L Weg einen entscheidenden Mechanismus zur Virusabwehr darstellt, ist er somit ein vielfacher Angriffspunkt viraler Immunevasion. Einige dieser Mechanismen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Angriffspunkt	Mechanismus	Virus
OAS	Inhibition über Assoziation mit unique short 11 Protein in Nuklease-sensitivem Komplex	Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV1) (181)
	NS1-vermittelte Sequestrierung der dsRNA	Influenza A Virus (147)
2-5 A	Abbau durch Phosphodiesterase – Aktivität des NS2 Protein	murines Coronavirus (226)
	kompetitive Hemmung durch Expression nichtaktivierender 2-5 A Derivate	HSV1, HSV2 und SV40 (31, 92)
RNase L	resistentere Quasispezies durch stille Mutationen zu weniger UA und UU – Sequenzen	HCV (85)
	Hochregulation des RLI	HIV – 1 (144)

Tabelle 3: Virale Hemmung des 2' 5' Oligoadenylat-Synthetase / RNase L Weges.

1.5.2 RNase A-Superfamilie

Ebenso wie bei der RNase L handelt es sich auch bei der RNase A um eine einzelstrangspezifische RNase. Sie ist konstitutiv aktiv und benötigt kein aktivierendes 2-5 A. Ebenso wie RNase L schneidet RNase A bevorzugt Einzelstränge, auch ähneln sich die Sequenzspezifitäten der beiden Enzyme.

Die RNase A-Superfamilie ist in Säugerzellen weit verbreitet und besteht aus RNasen mit zytotoxischen und antipathogenen Eigenschaften. Ihr Grundbauplan besteht aus einem 25 AS langen Signalpeptid und einem reifen Peptid von 130 AS Länge (24); aus

ihrer Summenformel ergibt sich eine molekulare Masse von 13,6 kDa (167). Humane RNase A schneidet präferentiell ssRNA nach Pyrimidine-Basen, es können aber auch Schnittstellen in dsRNA und nach Purin-Basen vorkommen (16, 213). Die Produkte des RNase A-Verdaus tragen ebenso wie die Produkte eines RNase L Verdaus eine 5' OH-Gruppe und ein 3' Monophosphat.

Die drei konservierten Aminosäuren His12, Lys41 und His119 spielen eine essentielle Rolle bei der katalytischen Aktivität der RNase A, der Austausch von nur einer dieser Aminosäuren durch Alanin kann die RNase-Aktivität um ein 10^4 -faches verringern (122, 167, 207).

Die Zytotoxizität der RNase A durch das Zerstören zellulärer RNA wird von zwei Faktoren bedingt: ihre Fähigkeit, ohne Schädigung durch Proteasen ins Zytosol zu gelangen, und der Bindung durch den RNase Inhibitor (RI). Dieser ist etwa 50 kDa groß und kommt mit einer Konzentration von 4 μ M ausschließlich im Zytoplasma vor. Die Inaktivierung der RNase erfolgt durch eine feste Bindung an den Inhibitor im Verhältnis 1:1 (178). Die drei Aminosäuren Lys7, Asn71 und Glu111 im RNase A-Molekül sind verantwortlich für die Bindung des RI, durch ihre Mutation zu Alanin kann eine Resistenz gegenüber dem RI und eine bis zu 10fach höhere Zytotoxizität erreicht werden (54). Natürlicherweise kommt eine erhöhte Zytotoxizität aufgrund veränderter RI-Bindung in der Onkonase vor, die aus den Oozyten des Frosches *Rana Pipiens* isoliert wird (12, 28). Im Gegensatz zur Onkonase ist humane pankreatische RNase 1 aufgrund ihrer RI-Bindefähigkeit nicht zytotoxisch (28), ebenso wie bovine RNase A (54).

Im Zusammenhang mit der angeborenen Immunität sind vor allem die beiden humanen RNasen Eosinophil Derived Neurotoxin (EDN) und Eosinophil Cationic Protein (ECP) bekannt. Beide werden in den Granula der Eosinophilen gespeichert. Sie haben antivirale, antibakterielle, antiparasitische und proinflammatorische Eigenschaften. Ebenfalls antibakterielle Eigenschaften hat auch Angiogenin (RNase 5), das außerdem an der Gefäßneubildung beteiligt ist. An der chemischen Hautbarriere ist die Skin derived RNase (RNase 7) beteiligt (24, 177). Von der pankreatischen RNase 1 ist hingegen nur bekannt, dass sie große RNA-Mengen beseitigt, die über die Nahrung in den Darm gelangt sind (199).

Einige Publikationen berichten über den Einsatz von RNasen als Krebstherapeutikum. In diesem Zusammenhang wird besonders der optimale Transfektionsweg diskutiert, auf dem die RNase weder durch Proteasen degradiert, noch durch den RI gehemmt

wird. Besonders durch Einsatz der Onkonase in der Krebstherapie ließen sich erste Erfolge erzielen und Apoptosen in den Tumorzellen einleiten (14, 184).

1.5.3 Rnase III

Die RNase III-Familie umfasst Doppelstrang-spezifische RNasen, die ihr Substrat in kürzere Fragmente mit einem 5' Monophosphat und einer 3' Hydroxy-Gruppe an einem 2 nt langen Überhang schneiden (59). Sie ist sowohl in die Prozessierung der pre-ribosomalen RNA (220) als auch in die miRNA-Biogenese und nachfolgende Genregulation involviert (216).

Die aus der microRNA-Biogenese bekannte Typ III RNase Dicer spielt eine Rolle in der angeborenen Immunität, wie bei Pflanzen, Wirbellosen und Pilzen gezeigt werden konnte. Sie prozessiert kurze interferierende RNAs („short interfering RNAs“, siRNAs) aus viralen Doppelstrang-Intermediaten oder Haarnadel-Strukturen, diese führen dann zur spezifischen Stilllegung viraler Genome und mRNAs (7).

1.6 Ribosomale RNA

Ribosomen bestehen sowohl aus Proteinen als auch aus RNA (209) und sind der Ort und limitierender Faktor zellulärer Proteinsynthese (87). Die Transkription ribosomaler Gene macht bis zu 60% der gesamten zellulären Transkription aus, die ribosomale RNA (rRNA) bis zu 80% des zellulären RNA-Gehaltes (87). Während die 5S rRNA separat durch die RNA-Polymerase III (43) transkribiert wird, erfolgt die Synthese der 18S, 5.8S und 28S rRNA als polycistronische 47S rRNA durch die RNA-Polymerase I im Nukleolus (87). 47S rRNA wird kotranskriptional zu 45S rRNA geschnitten (198). Die 45S rRNA wird im Nucleolus mit Hilfe von antisense kleinen nucleolaren RNAs („small nucleolar RNAs“, snoRNAs) zu reifen rRNA Spezies prozessiert, interne und externe transcribed spacers (ITS, ETS) werden herausgeschnitten und abgebaut (siehe Abbildung 6) (87, 151, 209). Weiterhin beinhaltet die Reifung der pre-rRNA Transkripte chemische Modifikationen wie 2'-O-Methylierungen, Pseudouridin und Basenmethylierungen. Diese liegen ausschließlich in den reifen rRNAs vor, nicht aber in den Spacern, und sind mit der ribosomalen katalytischen Funktion assoziiert. Auch die Lokalisation der Modifikationen wird durch snoRNAs vermittelt (50, 137).

Die lediglich in Eukaryotenzellen vorliegende ITS2 (149) wird für phylogenetische Analysen verwendet, da sie zwischen verschiedenen Spezies stärker in Sequenz und Länge variiert als deren Gensequenzen. Als Anhaltspunkt dient hierbei ihre stark konservierte Sekundärstruktur mit mehreren doppelsträngigen Bereichen (45, 104, 192).

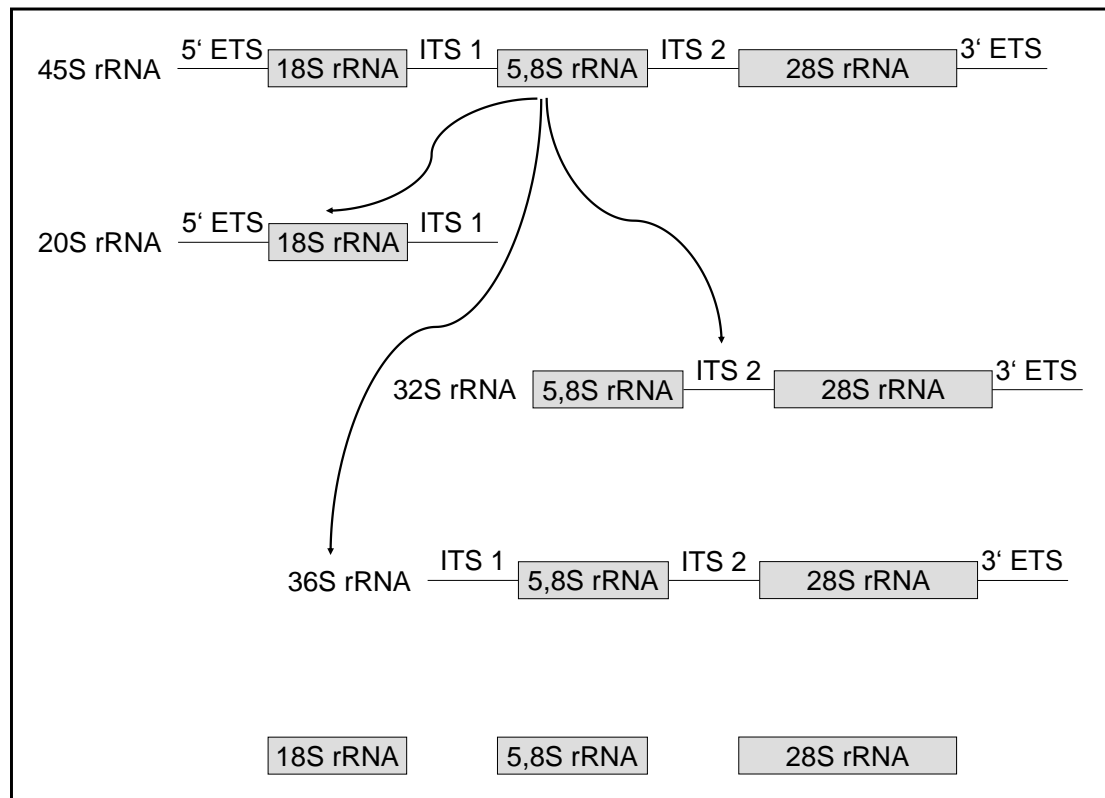


Abbildung 6: Prozessierung der 45S rRNA.

Graphische Darstellung: Struktur-RNA in grauen Kästen, Introns als Linien, Prozessierungsschritte als Pfeile. ETS = external transcribed spacer, IST = internal transcribed spacer. Gezeigt ist die Prozessierung der 45S rRNA in reife ribosomale RNAs und Intermediate.

1.7 Zielsetzung

Diese Dissertation soll sich mit RNA-vermittelten Stimulationen des angeborenen Immunsystems befassen. Das immunstimulatorische Potential RNase-verdauter zelleigener RNA soll untersucht und ein endogener RIG I Ligand ermittelt werden. Zudem soll ein spezifischer TLR8-Ligand charakterisiert werden.

In vorangegangenen Arbeiten (Tina von Thülen, Dissertation 2010) konnte bereits gezeigt werden, dass zelluläre RNA nach einem RNase A-Verdau *in vitro* zur Freisetzung von IFN- α aus der Zelle führt, unverdaute RNA diese Wirkung allerdings nicht hat. Da sowohl TLRs als auch RLRs zur Erkennung von RNA befähigt sind (1.4), ist nicht bekannt, welcher Rezeptor für diesen Effekt verantwortlich ist; dieser soll bestimmt werden. Ob die einzelnen Fragment-Komponenten des RNase-Verdau ihre immunstimulatorischen Eigenschaften entweder durch eine bestimmte Sequenz oder durch eine bestimmte Struktur erhalten ist ebenfalls unklar. Deshalb sollen die genaueren Charakteristika und die Sequenzen der immunstimulatorischen Fragmente ermittelt werden. Hierzu sollen die stimulatorischen Komponenten aufgereinigt und mittels Next Generation Sequencing sequenziert werden.

Ergänzend zu diesen Fragestellungen soll überprüft werden, ob nur ein RNase A-Verdau *in vitro* oder auch ein intrazellulärer RNase A-Verdau immunstimulatorische RNA-Fragmente generiert. Dies soll durch Transfektion von aktiven und inaktiven RNase A-Proteinen in das Zytoplasma immunkompetenter Zellen ermittelt werden.

Sowohl TLR7 als auch TLR8 erkennen einzelsträngige RNA, weisen allerdings Unterschiede in ihrer Sensitivität gegenüber RNA-Modifikationen auf (1.4.2). Diese Eigenschaften sollen ausgenutzt werden um einen Liganden zu ermitteln, der zwar TLR8, aber nicht TLR7 aktiviert. Dieser soll durch Immunstimulationen verschiedener humaner und muriner Zellen verifiziert werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Chemiekalien	Firma, Firmensitz
Agarose ultra pure	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Roth, Karlsruhe
Bacto - Agar	Becton Dickinson, Basel
Bleiacetat	Roth, Karlsruhe
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
CHAPS Pufferan®	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Citronensaure $C_6H_8O_7$	Merck, Darmstadt
Coelenterazin	PJK GmbH, Kleinblittersdorf
Coenzym A	PJK GmbH, Kleinblittersdorf
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	PJK GmbH, Kleinblittersdorf
Diethylpyrocarbonat DEPC	Roth, Karlsruhe
D-Luziferin	PJK GmbH, Kleinblittersdorf
Dulbecco's PBS	PAA, Cölbe
Eisessig	Roth, Karlsruhe
Ethanol 99,9 %	Roth, Karlsruhe
Ethanol, 70%	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure EDTA	Roth, Karlsruhe
FACS Clean	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS Flow	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS Rinse	BD Biosciences, San Jose, USA
Ficoll, Lymphozytenseparationsmedium	PAA, Cölbe
FITC	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumisothiocyanat	Roth, Karlsruhe
Holzleim (Ponal)	Henkel, Wien, Österreich
IPTG	Roth, Karlsruhe

Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid KCl	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat KHCO_3	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	Roth, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Serva, Heidelberg
LB Medium	Roth, Karlsruhe
6x Loading Dye Solution	New England Biolabs, Ipswich, USA
	Fermentas, St. Leon Rot
Lysozym	Fluka Analytical, Exeter, England
Magnesiumhydroxidcarbonat (MgCO_3) $_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat-Trihydrat $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$	Roth, Karlsruhe
Natriumazid NaNH_2	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid NaCl	Roth, Karlsruhe
Natrium-EDTA Na_2EDTA	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphatdihydrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Roth, Karlsruhe
Natronlauge, 0,5 M	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd, PFA	Roth, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
o-Phenylendiamin-Tabletten	Sigma-Aldrich, München
Poly C	Sigma-Aldrich, München
Proteaseinhibitor cOmplete EDTA-free	Roche, Mannheim
RapidStep™ ECL Reagent	EMD Chemicals, Darmstadt, Germany
S-Adenosyl Methionin	New England Biolabs, Ipswich, USA
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Sarkosyl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Schwefelsäure H_2SO_4	Roth, Karlsruhe
SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tetraethylammonium Chlorid (TEACl)	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim

Toluidine Blue O	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tricin	Roth, Karlsruhe
TRIS-Acetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
TrisBase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-Phosphat	Roth, Karlsruhe
TRIzol® Reagenzium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30%	Roth, Karlsruhe
Zinkchlorid ZnCl ₂	Roth, Karlsruhe

2.2 Geräte

Gerät	Model	Firma, Firmensitz
Agarosegelkammer		OWL, Weilheim
Analysenwaage	R160P-D1	Sartorius GmbH, Göttingen
Autoklav	Provit 2200	Holzner GmbH, Nussloch
Bakterieninkubator	Innova 4200	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Blot Modul	Fastblot B33	Biometra, Göttingen
Zell-Counter	Casy - 1TT	Schärfe System, Reutlingen
Durchflusszytometer	FACS Calibur	Becton Dickinson, Basel
Eismaschine	AF 10	Scotsman Ice Systems, Ipswich, UK
Entwicklermaschine	ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad
Gefrierschrank	Liebherr comfort	Liebherr, Ochsenhausen
	Hera freeze	Heraeus, Hanau
	REVCO	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Inkubator	HERA cell 240	Heraeus, Hanau
Kühlschrank		BEKO
		Liebherr, Ochsenhausen
Luminometer	Orion II	Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim
Magnetrührer	MR 2002	Heidolph, Schwabach
Mikroliterpipetten		Eppendorf, Hamburg
		Abimed, Langenfeld
Mikroplatten-Waschgerät	Skan Washer 400	Molecular Devices,

		Ismaning
Mikroskop	Wilovert	Will, Wetzlar
	Labovert	Leitz, Bielefeld
pH-Meter	pH523	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe	Pipetboy comfort	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plattenphotometer	E _{max}	Molecular Devices, Ismaning
Präzisionswaage	P100	Mettler Toledo, Gießen
RT-PCR	Mini Opticon	Bio-Rad, Hercules, USA
Schwenkplatte	Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
SDS-Gelelektrophoresekammer	Perfect Blue Twin S	Peqlab, Erlangen
Spannungsquelle	Standard PowerPack P25	Biometra, Göttingen
	Power Erase 500	Novex, San Diego, USA
Spektrophotometer	NanoDrop-1000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Sterilbank	BIOHIT	Heraeus, Hanau
	LaminAir HB 2448	Heraeus, Hanau
Stickstoff-Tank	Chronos	Messner, Griesheim
Thermocycler	iCycler	Bio – Rad, Hercules, USA
	Master cycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermo-Schüttler	TS-100	Peqlab, Erlangen
Tischzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
	Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Ultraschallstab	UW 2070	Bandelin, Berlin
Vortexer	Mikro 200R	Peqlab, Erlangen
	REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	LAUDA M20	LAUDA
Zentrifuge	Hera cell 240	Heraeus, Hanau
	Hera safe	Heraeus, Hanau
	Multifuge 1 L-R	Heraeus, Hanau
	Rotanta /RP	Hettich, Tuttlingen

2.3 Puffer und Lösungen

Annealing-Puffer nach Metabion	30 mM	HEPES-KOH, pH 7,4
	100 mM	KCl
	2 mM	MgCl ₂
	50 mM	NH ₄ Ac

	in u.p. H ₂ O	
Antikörper-Inkubationspuffer für Western Blots	0,1 %	Tween 20
	1 %	Milchpulver
	in TBS	
Blockierungspuffer für ELISA	1 %	BSA
	0,05 %	Tween 20
	in PBS _{def}	
Blockierungspuffer für Western Blots (10%)	10 %	Magermilchpulver
	in TBS	
DEPC-H ₂ O	1 ml	DEPC
	ad 1 l	ddH ₂ O
Entfärbelösung für Comassie	455 ml	Ethanol 99,9 %
	455 ml	ddH ₂ O
	90 ml	Eisessig
Erythrozyten-Lysepuffer	0,8%	NH ₄ Cl
	10 mM	KHCO ₃
	0,1 mM	EDTA
	in ddH ₂ O	
FACS Flow	0,001 %	Na-Azid
	in 1 x PBS _{def}	
Färbelösung für Comassie	1,25 g	Coomassie Brilliant Blue R-250
	500 ml	Entfärbelösung
Firefly-Assay-Puffer	470 µM	D-Luziferin
	270 µM	Coenzym A
	33,3 µM	DTT
	530 µM	ATP
	1,07 mM	(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ ·5H ₂ O
	2,67 mM	MgSO ₄
	20 mM	Tricin
	0,1 mM	EDTA
Gaussia-Assay-Puffer	5,72 µM	Coelenterazin
	2,2 mM	Na ₂ EDTA
	0,22 M	K _x PO ₄ (pH 5,1)
	0,44 mg / ml	BSA
	1,1 M	NaCl
	1,3 mM	NaN ₃
HEPES Buffered saline (HBS),	20 mM	HEPES

pH 7,4	150 mM NaCl in DEPC-H ₂ O
MOPS-Puffer, pH 7, 10x	2 M MOPS 50 mM C ₂ H ₃ NaO ₂ x 3H ₂ O 10 mM EDTA in ddH ₂ O
4% Paraformaldehyd in PBS _{def}	4 g PFA ad 100 ml PBS _{def}
10 x Phosphate Buffered Saline deficient (PBS _{def}), pH 7,2	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ 2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l dH ₂ O
10x Proteingellaufpuffer	10 g SDS 30 g Tris-Base 250 g Glycin ad 1 l dH ₂ O
SDS-PAGE -Sammelgelpuffer	2,52 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,1 ml 10 % SDS
SDS-PAGE- Trenngelpuffer	2,5 ml 2,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,1 ml 10 % SDS
Substratpuffer für ELISA	7,3 g C ₆ H ₈ O ₇ 11,87 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O ad 1 l ddH ₂ O
50x TAE, pH 8,0	242 g Tris-Base 57,1 g Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 ad 1 l dH ₂ O
Tris Buffered Saline (TBS), pH 7,6	50 mM Tris 150 mM NaCl in ddH ₂ O
Transferpuffer für Westernblot	5,8 g Tris-Base 2,3 g Glycin 100 ml EtOH ad 1 l dH ₂ O
Waschpuffer für ELISA	500 ml 10 x PBS 2,5 ml Tween 20

	ad 5 l	ddH ₂ O
Waschpuffer für Western Blots	0,1 %	Tween 20 in TBS
Waschpuffer für Zymogramme, pH 7,4	50 mM 5 mM	Tris-HCl EDTA in DEPC-H ₂ O
Zytometrie-Puffer	2 % 0,01 %	FCS Na-Azid in 1 x PBS _{def}

Puffer für NucleoBond - Säulen

R0 - Puffer, pH 6,3	15 %	Ethanol
	100 mM	TRIS-Acetat in DEPC-H ₂ O
R1 – Puffer, pH 6,3	15 %	Ethanol
	100 mM	TRIS-Acetat
	400 mM	KCl in DEPC-H ₂ O
Puffer A, pH 6,3	15 %	Ethanol
	100 mM	TRIS-Acetat
	650 mM	KCl in DEPC-H ₂ O
Puffer B, pH 6,3	15 %	Ethanol
	100 mM	TRIS-Acetat
	733 mM	KCl in DEPC-H ₂ O
Puffer C, pH 6,3	15 %	Ethanol
	100 mM	TRIS-Acetat
	850 mM	KCl in DEPC-H ₂ O
N5-Puffer, pH 8,5	15 %	Ethanol
	100 mM	TRIS-Phosphat
	1 M	KCl

in DEPC-H₂O

Puffer für Gesamt-RNA-Isolierung

10% Sarkosyl-Lösung (wt/vol)	10 g	Sarkosyl
	90 ml	DEPC-H ₂ O

0,75 M Natriumcitrat- Lösung	20,07 g	Natriumcitrat
pH 7	125 ml	DEPC-H ₂ O

Lösung D	250 g	Guanidinthiocyanat
	17,6 ml	0,75 M Natriumcitrat-Lösung
	26,4 ml	10% Sarkosyl-Lösung

Puffer für RNase A-Aufreinigung

Lysepuffer, pH 8	50 mM	Tris-HCl
	200 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
		in H ₂ O
		vor Benutzung frisch zugeben :
	10 mM	CHAPS
	5 mM	DTT

Rückfaltungspuffer, pH7	8 M	GuHCl
	50 mM	Tris-HCl
	200 mM	NaCl
	50 mM	DTT

2.4 Wachstumsmedien

2.4.1 Wachstumsmedien für Bakterien

LB-Agar (3,5 % w / v)	17,5 g	LB-Agar (Lennox) Roth, Karlsruhe
	ad 500 ml	ddH ₂ O
LB-Medium	20 g	LB-Medium (Lennox) Roth, Karlsruhe
	ad 1 l	ddH ₂ O
SOC Outgrowth Medium		New England Biolabs, Ipswich, USA

3.1.1 Wachstumsmedien für Säugerzellen

Name	Firma, Firmensitz
2 x MEM	Invitrogen, Karlsruhe
Amino Acids, non-essential (100x)	PAA, Cölbe
β-Mercaptoethanol	Gibco, Karlsruhe
DMEM High Glucose (4,5 g / l)	PAA, Cölbe
FCS (Fetal Calf Serum)	Biochrom AG, Berlin
humanes AB-Serum	Sigma Aldrich, München
L – Glutamin 200 mM (100x)	PAA, Cölbe
Opti - MEM	Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (10,000 U Penicillin / ml, 10 mg Streptomycin / ml) (100x)	PAA, Cölbe
RPMI 1640	PAA, Cölbe
Sodium Pyruvat Solution, 100mM	PAA, Cölbe
Trypsin-EDTA, 10x	PAA, Cölbe

2.5 Zellen

2.5.1 Prokaryotische Zellen

Name	Firma, Firmensitz
BL21-CodonPlus® Competent Cells	Stratagene, La Jolla, USA
JM109 High Efficiency Competent Cells	Promega, Fitchburg, USA
NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA

2.5.2 Zelllinien

Name	Ursprung
A549	Humanes alveoläres basales Epithelzell-Karzinom
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen
HEK-Blue™ TLR8	Stabil transfizierte HEK-Zelllinie
HeLa	Humanes Zervixkarzinom
Huh7	Humanes hepatozelluläres Karzinom
Huh7.5	Huh7 Subklon
MDCK	Nierenzelle des Cocker Spaniels
Vero	Epitheliale Nierenzelle der afrikanischen Grünen Meerkatze

2.5.3 Humane primäre Zellen

Buffy coats

Blutbank des Universitätsklinikums Gießen-Marburg

2.6 Mäuse

Sämtliche verwendeten Mäuse wurden von der Immunologie Marburg gezüchtet.

Mausstamm	Bezugsquelle
C57BL/6 Wildtyp	Animal Facility, BMFZ, Marburg
IPS defiziente Mäuse mit C57BL/6 Ursprung	Prof. Jürg Tschopp, Lausanne, Schweiz
TLR7 defiziente Mäuse mit C57BL/6 Ursprung	Prof. Dr. Shizo Akira; Osaka; Japan
TLR379 defiziente Mäuse mit C57BL/6 Ursprung	Prof. Dr. Stefan Bauer, Marburg

2.7 Stimulanzen

Bezeichnung	Sequenz / Beschreibung	Firma, Firmensitz
5'ppp dsRNA (19 mer)	5'- pppGCA UGC GAC CUC UGU UUG A -3' 3'- CGU ACG CUG GAG ACA AAC U -5'	InvivoGen, San Diego, USA
CpG2216 PTO (20 mer)	5'-GsGsG GGA CGA TCG TCsGs GsGsGs GsG-3' (s = Thiol-modifizierte Phosphatgruppen)	TIB Molbiol, Berlin
LPS	Lipopolysaccharid aus <i>E.coli</i>	Difco Laboratories, Franklin Lakes, USA
Polyl:C	Polyinosinic-polycytidylic acid synthetisches Analog zu dsRNA	InvivoGen, San Diego, USA
R848	Resiquimod (synthetisches Nukleosidanalogen)	Coley Pharmaceutical Group, Düsseldorf
RNA40	5'-GCC CGU CUG UUG UGU GACUsC-3'	IBA, Göttingen

2.8 Transfektionsreagenzien

Name	Firma, Firmensitz
DOTAP Transfection Reagent	Roche, Mannheim
Lipofectamine™ 2000	Life Technologies, Carlsbad, USA
Lipofectamine RNAiMAX Reagent	Life Technologies, Carlsbad, USA
SAINT PhD	Synvolux Therapeutics, Groningen, Niederlande

2.9 Verbrauchsmaterial

Name	Firma, Firmensitz
6-well Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
12-well Platte	Costar Corning Inc., Tewksbury, USA
96well Flachbodenplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96well Maxisorp Platte Nunc	Thermo Fisher Scientific, Denmark
96well PolySorp Platte Nunc	Thermo Fisher Scientific, Denmark
96well Rundbodenplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96well Rundbodenplatte, microcon unsteril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Casy-Röhrchen	Schärfe System, Reutlingen
Chirurgische Einmal-Skalpelle	Braun, Melsungen
Filterspitzen (10 µl / 100 µl / 1000 µl)	Sorenson Bioscience, USA
Kanülen (20 G / 24 G)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kombitips	Eppendorf, Hamburg
Latex-Handschuhe	VWR, Leuven, Belgien
low retention Filterspitzen (10 µl / 100 µl / 1000 µl)	Kisker, Steinfurt
low retention Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Kisker, Steinfurt
Nitril-Handschuhe	VWR, Leuven, Belgien
Papiertücher	Tork, Mannheim
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10 µl / 100 µl / 1000 µl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Plastikpipetten (5 ml / 10 ml / 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polypropylene Rundboden-Reaktionsgefäße	Falcon Becton Dickinson, USA
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Biostep, Jahnsdorf
Reaktionsgefäße (0,5 ml / 1,5 ml / 2,0 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (15 ml / 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Röntgenfilme	Kodak, Rochester, USA
Scotch - Sterilisationsband	Kobe, Marburg
Spritzen „Omnifix“ (1 ml / 5 ml / 10 ml / 20 ml)	Braun, Melsungen
Sterilfilter (0,45 µM)	Sigma – Aldrich, München
Terralin® liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
UltraLink® Immobilized Streptavidin	Thermo Scientific, Wilmington, USA

Vernichtungsbeutel 300 x 200 mm	Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim
Vernichtungsbeutel 600 x 780 x 0,05 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Vinyl - Handschuhe	NOBA Verbandmittel, Wetter
Zellkulturschalen	Falcon Becton Dickinson, USA
	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellsieb 70 µm Nylon	Falcon Becton Dickinson, USA
Zytometrie- Röhrchen	Falcon Becton Dickinson, USA

2.10 Nukleinsäuren und Nukleotide

2.10.1 Nukleinsäuren als Größenstandard

Name	Firma, Firmensitz
100 bp DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot
O'RangeRuler 5 bp DNA Ladder	Thermo Scientific, Wilmington, USA
RiboRuler™ High Range RNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot

2.10.2 siRNAs

Name	Target	Firma, Firmensitz
Hs_DDX58_6	RIG I	Qiagen, Hilden
Hs_DDX58_8	RIG I	Qiagen, Hilden
Hs_DDX58_10	RIG I	Qiagen, Hilden
Hs_DDX58_11	RIG I	Qiagen, Hilden
Hs_IFIH1_8	MDA 5	Qiagen, Hilden
All Star negative control	Negativkontrolle	Qiagen, Hilden

2.10.3 Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide

Name	Firma, Firmensitz
Poly C	PAA, Cölbe
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP)	Invitrogen, Karlsruhe

2.10.4 RNA-Oligonukleotide

Oligonukleotide für RIG I Projekt:

Name	Sequenz	Firma, Firmensitz
40mer	5'- GGU UUA GUG AGG CCC UCG GAU CGG CCC CGC CGG GGU CGG C -3'	BioSpring, Woburn, USA
43mer	5'- GGA UGG UUU AGU GAG GCC CUC GGA UCG GCC CCG CCG GGG UCG G -3'	IBA, Olivette, USA
44mer	5'- GGA UGG UUU AGU GAG GCC CUC GGA UCG GCC CCG CCG GGG UCG GC -3'	BioSpring, Woburn, USA
48mer	5'- GAU UGG AUG GUU UAG UGA GGC CCU CGG AUC GGC CCC GCC GGG GUC GGC -3'	BioSpring, Woburn, USA
18SrRNA1768-1798	5'- ACG GCC CUG GCG GAG CGC UGA GAA GAC GGU C -3'	IBA, Olivette, USA
18SrRNA1768-1812	5'- ACG GCC CUG GCG GAG CGC UGA GAA GAC GGU CGA ACU mUGA CUA UCU -3' 2-O-Methyluridin auf Position 37	IBA, Olivette, USA
45S 8690 – 8751	5'- GUC CGU CCG UCC GUC CGU CCU CCU CCU CCC CCG UCU CCG CCC CCC GGC CCG CCG UCC UCC CU -3'	Eurofins, Ebersberg
45S 8752 – 8813	5'- CGG GAG GGC GCG CGG GUC GGG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GUG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GC -3'	Eurofins, Ebersberg
45S 7219 – 7290	5'- GGU GGU GGG GGA GGA GGA AGG CGG GUC CGG AAG GGG AAG GGU GCC GGC GGG GAG AGA GGG UCG GGG GAG CGC -3'	Eurofins, Ebersberg
45S 7349 – 7417	5'- GCC GCU CCC GCG CCC CUC CUC CUC CCC GCC GCC CCU CCU CCG AGG CCC CGC CCG UCC UCC UCG CCC UCC -3'	Eurofins, Ebersberg
Gegenstrang lang	5'- ACG GCC CUG GCG GAG CGC UGA GAA GAC GGU CGA ACU UGA CUA UCU -3'	IBA, Olivette, USA

Oligonukleotide für TLR8 Projekt:

Name	Sequenz	Firma, Firmensitz
RNA63	5'- CAG GUC UGU GAU -3'	IBA, Olivette, USA
RNA63CH ₃	5'- CAmG GUC UGU GAU -3'	IBA, Olivette, USA

	2-O-Methylguanosin auf Position 3	
RNA63deoxy	5'- CAdG GUC UGU GAU -3' Desoxyguanosin auf Position 3	IBA, Olivette, USA
RNA63F	5'- CAFG GUC UGU GAU -3' 2-Fluoroguanosin auf Position 3	IBA, Olivette, USA

2.10.5 DNA-Oligonukleotide (Primer)

Sämtliche Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

Name	Sequenz	Zielsequenz/Verwendung
18SrRNA-L	5'- AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG -3'	humane 18S rRNA
18SrRNA-R	5'- CCC TCT TAA TCA TGG CCT CA -3'	humane 18S rRNA
18ST7ab44mer_sense	5'- TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAT GGT TTA GTG AGG CCC TC -3'	IVT 44mer + Gegenstrang
18ST7Frag_rev	5'- AGA TAG TCA AGT TCG ACC GTC -3'	IVT 44mer + Gegenstrang
28S 2282 fw stem loop	5'- GCG CAG GAG GGC CGC T -3'	stem-loop PCR nach Chen et al
28S 3624 fw stem loop	5'- GCC GCC GCC AGG GGA AT -3'	stem-loop PCR nach Chen et al
3' pGEM	5'- CAG GCG GCC GCA CTA G -3'	pGEM Vektor
5' pGEM	5'- GGC CGC CAT GGC CGC -3'	pGEM Vektor
5' 7198	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GCG TGT TGC GTG -3'	ITS2-Konstrukt für IVT
3' 7198	5'- GGG CGC GCG TAC GC -3'	ITS2-Konstrukt für IVT
5' 7242	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TCC GGA AGG GGA A -3'	ITS2-Konstrukt für IVT
3' 7242	5'- GCC TCG GAG GAG GGG -3'	ITS2-Konstrukt für IVT
40 mer fw stem loop	5'- GCG GGG TTT AGT GAG GCC C -3'	stem-loop PCR nach Chen et al
44 mer fw stem loop	5'- GCG GCG GAT GGT TTA GTG AG -3'	stem-loop PCR nach Chen et al
48 mer fw stem loop	5'- GCG ACG GAT TGG ATG GTT TAG -3'	stem-loop PCR nach Chen et al
63 mer fw stem loop	5'- GCC CAC GGC CCT GGC GGA G -3'	stem-loop PCR nach Chen et al
Gegenstrang fw	5'- GCC CA CGG CCC TGG	stem-loop PCR nach Chen

	CGG AG -3'	et al
Seg4-L	5'- GGA GAA GGA GGG CTC ATA CC -3'	Influenza Segment 4
Seg4-R	5'- CCT GAC GTA TTT TGG GCA CT -3'	Influenza Segment 4
Seg5-L	5'- TGC TTC AAA ACA GCC AAG TG -3'	Influenza Segment 5
Seg5-R	5'- TGA TTT CGG TCC TCA TGT CA -3'	Influenza Segment 5
RT 28S 2282 stem loop	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA CCG C -3'	stem-loop PCR nach Chen et al
RT 28S 3624 stem loop	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACG TCG G -3'	stem-loop PCR nach Chen et al
Reverse Primer stem loop	5'- GTG CAG GGT CCG AGG T -3'	stem-loop PCR nach Chen et al
RT – Fragment stem loop	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACG CCG AC -3'	stem-loop PCR nach Chen et al, 40mer – 48mer
RT Geg 66 nt	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACG TTA CG -3'	stem-loop PCR nach Chen et al
RT Geg 63 nt	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA CGA CT -3'	stem-loop PCR nach Chen et al
RT Geg 59 nt	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA CTT TT -3'	stem-loop PCR nach Chen et al
RT Gegenstrang lang	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA GAT AG -3'	stem-loop PCR nach Chen et al
RT Gegenstrang kurz	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACG ACC GT -3'	stem-loop PCR nach Chen et al
T7-pcDNA4	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'	T7 – Promotor
T7 18S 1514 – 1840 5'	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GCT GCA CGC GCG -3'	18S Kontrolle für IVT
18s 1514 – 1840 3'	5'- AAA CCT TGT TAC GAC TTT TAC TTC C -3'	18S Kontrolle für IVT

T7 45s 6530 – 6717 5'	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CGT GCC GCG CCA G -3'	ITS1 + 5s Kontrolle für IVT
45s 6530 – 6717 3'	5'- GGC AAG CGA CGC TCA GAC -3'	ITS1 + 5s Kontrolle für IVT
T7 GAPDH 5'	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CTC ATG ACC ACA GTC CA -3'	GAPDH Kontrolle für IVT
T7 GAPDH 3'	5'- GGC AAT GCC AGC CCC AG -3'	GAPDH Kontrolle für IVT
T7 Tubulin 5'	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC ACA GGC TCT GGA ATG -3'	Tubulin-Kontrolle für IVT
Tubulin 3'	5'- GGC TGA GAC AAG GTG GTT CA -3'	Tubulin-Kontrolle für IVT
über Geg fw stem loop	5'- GCC CAG AGG AAG TAA AAG TCG T -3'	stem-loop PCR nach Chen et al

2.10.6 DNA-Oligonukleotide für in vitro Transkriptionen

Alle Konstrukte wurden mittels PCR synthetisiert. Bei den ITS2-Konstrukten wurde das von Life Technologies gelieferte Plasmid pMK-RQ 7143–7500 als Template eingesetzt, bei den sonstigen Kontrollen erfüllte isolierte Gesamt-RNA aus humanen Zellen diesen Zweck.

Name	Sequenz
ITS2 7198 – 7436	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GCG TGT TGC GTG CGG TGT GGT GGT GGG GGA GGA GGA AGG CGG GTC CGG AAG GGG AAG GGT GCC GGC GGG GAG AGA GGG TCG GGG GAG CGC GTC CCG GTC GCC GCG GTT CGC CGC CCG CCC CCG GTG GCG GCC CGG CGT CCG GCC GAC CGC CGC TCC CGC GCC CCT CCT CCT CCC CGC CGC CCC TCC TCC GAG GCC CCG CCC GTC CTC CTC GCC CTC CCC GCG CGT ACG CGC GCC C -3'
ITS2 7242 – 7395	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TCC GGA AGG GGA AGG GTG CCG GCG GGG AGA GAG GGT CGG GGG AGC GCG TCC CGG TCG CCG CGG TTC GCC GCC CGC CCC CGG TGG CGG CCC GGC GTC CGG CCG ACC GCC GCT CCC GCG CCC CTC CTC CTC CCC GCC GCC CCT CCT CCG AGG C -3'
Kontrolle 18s	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GCT GCA CGC GCG CTA CAC TGA CTG GCT CAG CGT GTG CCT ACC CTA CGC CGG CAG GCG CGG GTA ACC CGT TGA ACC CCA TTC GTG ATG GGG ATC GGG GAT TGC AAT TAT TCC CCA TGA ACG AGG AAT TCC CAG TAA GTG CGG GTC ATA AGC TTG CGT TGA TTA AGT CCC TGC CCT TTG TAC ACA CCG CCC GTC GCT ACT ACC GAT TGG ATG GTT TAG TGA GGC CCT CGG ATC GGC CCC GCC GGG GTC GGC CCA CGG CCC TGG CGG AGC GCT GAG AAG ACG GTC GAA CTT GAC TAT CTA GAG GAA GTA AAA

	GTC GTA ACA AGG TTT -3'
Kontrolle ITS1 + 5s	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CGT GCC GCG CCA GGA AGG GCC TCC TCC CGG TGC GTC GTC GGG AGC GCC CTC GCC AAA TCG ACC TCG TAC GAC TCT TAG CGG TGG ATC ACT CGG CTC GTG CGT CGA TGA AGA ACG CAG CTA GCT GCG AGA ATT AAT GTG AAT TGC AGG ACA CAT TGA TCA TCG ACA CTT CGA ACG CAC TTG CGG CCC CGG GTT CCT CCC GGG GCT ACG CCT GTC TGA GCG TCG CTT GCC -3'
Kontrolle GAPDH mRNA	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CTC ATG ACC ACA GTC CAT GCC ATC ACT GCC ACC CAG AAG ACT GTG GAT GGC CCC TCC GGG AAA CTG TGG CGT GAT GGC CGC GGG GCT CTC CAG AAC ATC ATC CCT GCC TCT ACT GGC GCT GCC AAG GCT GTG GGC AAG GTC ATC CCT GAG CTG AAC GGG AAG CTC ACT GGC ATG GCC TTC CGT GTC CCC ACT GCC AAC GTG TCA GTG GTG GAC CTG ACC TGC CGT CTA GAA AAA CCT GCC AAA TAT GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG AAG CAG GCG TCG GAG GGC CCC CTC AAG GGC ATC CTG GGC TAC ACT GAG CAC CAG GTG GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC GAC ACC CAC TCC TCC ACC TTT GAC GCT GGG GCT GGC ATT GCC -3'
Kontrolle Tubulin mRNA	5'- TAATACGACTCACTATAG GGC ACA GGC TCT GGA ATG GGC ACT CTC CTT ATC AGC AAG ATC CGA GAA GAA TAC CCT GAT CGC ATC ATG AAT ACC TTC AGT GTG GTG CCT TCA CCC AAA GTG TCT GAC ACC GTG GTC GAG CCC TAC AAT GCC ACC CTC TCC GTC CAT CAG TTG GTA GAG AAT ACT GAT GAG ACC TAT TGC ATT GAC AAC GAG GCC CTC TAT GAT ATC TGC TTC CGC ACT CTG AAG CTG ACC ACA CCA ACC TAC GGG GAT CTG AAC CAC CTT GTC TCA GCC -3'

2.10.7 RNase A-Konstrukte

Sämtliche RNase A-Konstrukte wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) in einem pEX-A-Vektor geliefert und in einen pET-24a Vektor umklontiert. Die angegebene Sequenz des RNase A-wt Konstrukt wurde von der humanen pankreatischen Ribonuklease A (NCBI-Ref: NM 198232.1) abgeleitet:

5'- GCT AGC CAC CAC CAC CAC CAC GGC ATT AGC TAC GGT CGT AAA
AAA CGT CGT CAG CGT CGT CGT AAG GAA TCC CGG GCC AAG AAA TTC CAG
CGG CAG CAT ATG GAC TCA GAC AGT TCC CCC AGC AGC AGC TCC ACC TAC
TGT AAC CAA ATG ATG AGG CGC CGG AAT ATG ACA CAG GGG CGG TGC AAA
CCA GTG AAC ACC TTT GTG CAC GAG CCC CTG GTA GAT GTC CAG AAT GTC
TGT TTC CAG GAA AAG GTC ACC TGC AAG AAC GGG CAG GGC AAC TGC TAC
AAG AGC AAC TCC AGC ATG CAC ATC ACA GAC TGC CGC CTG ACA AAC GGC
TCC AGG TAC CCC AAC TGT GCA TAC CGG ACC AGC CCG AAG GAG AGA CAC

ATC ATT GTG GCC TGT GAA GGG AGC CCA TAT GTG CCA GTC CAC TTT GAT
GCT TCT GTG GAG GAC TCT ACC TGA CTC GAG -3'

Die Herstellung der verschiedenen Mutanten erfolgte wie unter 4.2.2 beschrieben.

2.10.8. spezielle DNA-Oligonukleotide

Alle speziellen DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma IBA (Olivette, USA) synthetisiert.

Name	Sequenz	Verwendung
18SrRNAantibio	5'- (BIO-TEG)TAA TGA TCC TTC CGC AGG TTC ACC TAC GGA AAC -3'	Oligo zur 18S rRNA Aufreinigung
3' Adapter	5'- (PHOSPHATE)TTT AAC CGC GAA TTC CAG(C ₆ NH ₂) -3'	Adapterligations-Klonierung nach Hafner et al
5' Adapter	5'- ACG GAA TTC CTC ACT AAA -3' DNA/RNA, unmodifizierte RNA auf Position 16 – 18	Adapterligations-Klonierung nach Hafner et al
3' PCR – Primer	5'- GAC TAG CTG GAA TTC GCG GTT AAA -3'	Adapterligations-Klonierung nach Hafner et al
5' PCR – Primer	5'- CAG CCA ACG GAA TTC CTC ACT AAA -3'	Adapterligations-Klonierung nach Hafner et al

2.11 Kits

Name	Firma, Firmensitz
2xLysis-Juice 2	PJK GmbH, Kleinblittersdorf
ABsolute qPCR Sybr Green Mix	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Ambion ® RNA Fragmentation Reagents	Ambion, Carlsbad, USA
AmpliScribe™ High Yield Transcription Kits	Epicentre, Madison, USA
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Waltham, USA
CloneJET PCR Cloning Kit	Fermentas, Waltham, USA
DNase I recombinant RNase free	Roche, Basel, Schweiz
Econo-Pac® 10 DG Desalting Columns	Bio-rad, Hercules, USA
GeneJET PCR Purification Kit	Fermentas, Waltham, USA
NucleoBond-Säule DNA/RNA400	MACHEREY-NAGEL, Düren

peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab, Erlangen
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen
pGEM® T Easy Vektor Systems	Promega, Fitchburg, USA
Phusion Polymerase Kit	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, Waltham, USA
T4-Ligase	Fermentas, Waltham, USA
Taq PCR Master Mix Kit"	Qiagen, Hilden

2.12 Proteine

2.12.1 Enzyme

Name	Firma, Firmensitz
Calf intestine phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Benzonase® Nuklease	Merck, Darmstadt
Lysozym	Sigma-Aldrich, Steinheim
NheI	New England Biolabs, Ipswich, USA
Poly (U) Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA
RNase III, E.coli	Epicentre, Madison, Wisconsin
RNase H	New England Biolabs, Ipswich, USA
Ribonuclease A (RNase A)	Qiagen, Hilden
Shrimp alkaline phosphatase (SAP)	Fermentas, St. Leon Rot
T4 Polynukletid-Kinase (PNK)	Fermentas, St. Leon Rot
Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)	Thermo Scientific, Wilmington, USA
XhoI	New England Biolabs, Ipswich, USA

2.12.2 Antikörper

ELISA

Name	Firma, Firmensitz
rat monoclonal anti-mouse IFN-alpha	PBL Interferon Source, Piscataway, USA
rabbit polyclonal anti-mouse IFN-alpha	PBL Interferon Source, Piscataway, USA
anti-mouse IL6	R&D Biosystems, Wiesbaden
biotin-rat anti-mouse IL6	R&D Biosystems, Wiesbaden

POD-conjugated goat anti-rabbit IgG	Immuno Research, West Grove, USA
rat anti-human IL6	Pharmingen, Leiden, Niederlande
biotin rat anti-human IL6	Pharmingen, Leiden, Niederlande
anti-human IFN-alpha Coating Antibody	PBL Interferon Source, Piscataway, USA
anti-human IFN-alpha HRP-Conjugate	eBioscience, San Diego, USA
anti-hCXCL10 / IP10	R&D Biosystems, Wiesbaden
anti-hCXCL10 / IP10, Detection Antibody	R&D Biosystems, Wiesbaden
anti-hCCL5 / RANTES	R&D Biosystems, Wiesbaden
anti-hCCL5 / RANTES, Detection Antibody	R&D Biosystems, Wiesbaden
Streptavidin-POD Konjugat	Roche, Basel, Schweiz

Durchflusszytometrie

Spezifität	Markierung	Ursprung	Firma, Firmensitz
B220	FITC	Ratte	eBioscience, San Diego, USA
CD11b	APC	Ratte	BD Pharmingen, Heidelberg
CD11c	APC	Hamster	eBioscience, San Diego, USA
CD11c	FITC	Hamster	BD Pharmingen, Heidelberg
F4/80	FITC	Ratte	eBioscience, San Diego, USA
Fc-Block, IgG	-	Maus, Ratte, Hamster	Immuno Research, West Grove, USA
MHCI	PE	Zellklon	eBioscience, San Diego, USA
MHCII	PE	Zellklon	eBioscience, San Diego, USA
TO-PRO-3	APC	Totfarbstoff	Invitrogen, Karlsruhe

2.12.3 Zytokine

Name	Firma, Firmensitz
murines IL6	R&D Biosystems, Wiesbaden
murines IFN α	Immunologie Marburg
humanes IFN α	PeproTech, Rocky Hill, USA
humanes IL6	ImmunoTools, Friesoythe
humanes IP10	IC Chemikalien GmbH, Ismaning
humanes RANTES	R&D Biosystems, Wiesbaden
humanes TNF α	PeproTech, Rocky Hill, USA

2.13 Vektoren und rekombinante Plasmide

Name	Bezugsquelle
------	--------------

pCAGGS	Institut für Virologie, Marburg
pcDNA3.1 (-)	Institut für Immunologie, Marburg
pcDNA3.1-eGFP	Institut für Immunologie, Marburg
pcDNA3.1-Luciferase (NFκB-Reporter)	Institut für Immunologie, Marburg
pcDNA3.1-hRIG-I	Institut für Immunologie, Marburg
pcDNA3.1-hTLR7	Institut für Immunologie, Marburg
pcDNA3.1-hTLR8	Institut für Immunologie, Marburg
pEFmda5-myc	Richard Randall, St. Andrews
pET-24A	Novagene, Darmstadt
pGL3-NF-κB-Gaussia	Dr. Winfried Barchet, Bonn
pHa-mda5-TOPO	Andreas Pichlmeier, Martinsried
pMK-RQ 7143–7500	Life Technologies, Carlsbad, USA
pMA 8653-8860	Life Technologies, Carlsbad, USA

2.14 Software

Name	Firma, Firmensitz
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	National Institutes of Health, Bethesda, USA
CellQuestPro	BD Bioscience, San Jose, USA
Chromas2	Technelysium, South Brisbane, Australia
EndNote X3	The Thomson Corporation, Stanford, USA
Excel 2010	Microsoft, Redmond, USA
FlowJo	Treestar, San Carlos, USA
mfold Web Server	The RNA Institute, Albany, USA
OligoCalc	Northwestern University, Evanston, USA
Opticon Monitor™ Software	Bio-rad, Hercules, USA
PowerPoint 2003	Microsoft, Redmond, WA, USA
SigmaPlot	Systat Software GmbH, Erkrath
Simplicity	Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim
SoftMaxPro v5	Molecular Devices, Ismaning
Word 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA

3 Methoden

3.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.1.1 Analyse von Nukleinsäure-Fragmenten (DNA- oder RNA-Fragmenten)

3.1.1.1 Elektrophoretische Auftrennung nach Fragmentlänge durch analytische Agarosegele

In der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäure-Stücke in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt. Es entsteht ein charakteristisches Bandenmuster, welches sowohl die Auswertung einer Polymerase-Kettenreaktion (3.1.2) als auch eines Restriktionsverdau (3.1.3) erlaubt.

Da ihnen ihr Phosphorsäurerest eine negative Ladung verleiht, wandern Nukleinsäure-Fragmente im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode; hierbei bewegen sich kleinere Stücke schneller als größere. Mit Hilfe des interkalierenden DNA-Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid lassen sie sich schließlich unter UV-Bestrahlung als Banden im Gel nachweisen.

Für DNA-Gele wird ein Azetat-EDTA-Puffer (TAE), für RNA-Gele ein Morpholino-Propansulfonsäure (MOPS)-Puffer verwendet. Um RNasen-vermittelte Degradation der RNA zu vermeiden, werden Elektrophoresekammer, Gelschlitten und Kamm im Vorfeld mit einer 3%igen (w/w) Wasserstoffperoxid-Lösung behandelt. Eine 1-3%ige (w/v) Lösung aus Agarose und Puffer wird bis zum Schmelzen aufgekocht und auf einen Gelschlitten gegossen. Nach Auspolymerisierung wird das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt und vollständig mit Puffer bedeckt. Nukleinsäure-Proben mit konzentrationsabhängigen Volumina zwischen 1 µl und 10 µl werden mit Ladepuffer versetzt und in die Taschen pipettiert, ebenso 0,3 µg eines Größenmarkers mit definierten Fragmentlängen. An die Kammer wird eine Spannung von 100 V angelegt.

Nach Beendigung des Gellaufes erfolgt eine 10-minütige Inkubation des Gels in wässriger Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml). Die Anregung des Ethidiumbromides erfolgt mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 300 nm, die Dokumentation mit dem Programm „BioPrint“ von MWG BioTech (modifiziert aus (105)).

3.1.1.1 Elektrophoretische Auftrennung nach Fragmentlänge durch analytische Polyacrylamid-Gele (PAGE)

Für eine Auftrennung von Fragmenten unter 200 bp empfiehlt sich aufgrund ihrer höheren Auflösung die Verwendung von Polyacrylamid-Gelen. Ein Gel mit 15% Acrylamid setzt sich wie folgt zusammen:

	Volumen [µl]
H ₂ O	3350
30% Acryl - Bisacrylamid	3500
50 x TAE	140
10% Ammonium persulfate (APS)	17,5
99% Tetramethylethyldiamin (TEMED)	11

Tabelle 4: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele.

Die Polymerisierung des Gels wird durch APS und TEMED initiiert.

Die zu untersuchenden Proben werden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt. Bis zu 5 µg einer so behandelten Probe werden in eine Tasche des auspolymerisierten Gels pipetiert. An die Gelkammer wird eine Spannung von 100 bis 120 Volt angelegt. Der Gellauf ist beendet, wenn die sichtbare Bromphenolblau-Bande am unteren Ende des Gels angekommen ist. Die Nukleinsäuren werden in einer 1:10.000 Verdünnung SYBR Gold in TAE für 5 min gefärbt und dann mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 302 nm sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgt ebenfalls mit dem Programm „BioPrint“.

.

3.1.1.2 Sequenzierungen

Sämtliche Sequenzierungen wurden von der Firma SEQLAB in Göttingen als Barcode Economy Run Service durchgeführt. Dieses Verfahren funktioniert nach der Didesoxymethode nach Sanger, wobei die vier Abbruchnukleotide mit verschiedenen Fluoreszenzstoffen markiert sind und über diese nachgewiesen werden.

Die einzuschickenden Proben enthalten jeweils:

1,2 µg DNA
30 pmol Sequenzierungsprimer
Wasser ad 15 µl

Die so ermittelten Sequenzen werden auf der Internetseite der Firma SEQLAB bereitgestellt und mit Chromas und bl2seq aus dem NCBI Toolkit weiter ausgewertet (modifiziert aus (105)).

3.1.1.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit einer Probe

Da die aromatischen Ringe der Basen einer Nukleinsäure Licht einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren, lässt sich aus der Stärke der Absorption_{260 nm} in einer Probe deren DNA-Konzentration bestimmen. Die Reinheit einer Probe lässt sich aus dem Quotienten $\text{Absorption}_{260 \text{ nm}} : \text{Absorption}_{280 \text{ nm}}$ ermitteln. Wenn der Quotient von A260/A280 zwischen 1,9 und 2,1 liegt, hat die RNA eine optimale Reinheit. Proteinkontaminationen hingegen absorbieren Licht der Wellenlänge 280nm und senken somit den Quotienten A260/ A280. Bei einer DNA-Probe sollte der Quotient A260/A280 zwischen 1,8 und 1,9 liegen (114).

Die Messungen wurden an einem NanoDrop 1000 durchgeführt (modifiziert aus (105)).

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ermöglicht die Amplifikation von DNA-Sequenzen, deren gezielte Veränderung und Konzentrationsbestimmung. Sie wird gekennzeichnet durch den zyklischen Wechsel von Denaturierungstemperatur zur Auftrennung des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge, Anlagerungstemperatur der Primer an die jeweiligen Einzelstränge und dem Temperaturoptimum der Polymerase zur Elongation (Vervollständigung) des DNA-Doppelstranges.

Der Ansatz einer PCR-Reaktion mit der Taq-Polymerase enthält jeweils:

0,1-1 µg	Ausgangs-DNA
0,1 µM	Primer A
0,1 µM	Primer B
200 µM	aller vier Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
25 µl	Taq - Mastermix
Wasser ad 50 µl	

Das Grundprogramm der PCR setzt sich wie folgt zusammen:

1x	Denaturierung	94°C	3 min
25x	Denaturierung	94°C	1 min
	Anlagerung	$T_m \text{ (Primer)} - 5^\circ\text{C}$	1 min
	Elongation	72°C	1 min / kb Amplikon
	finale Elongation	72°C	10 min
	Lagerung	4°C	

Für besonders schwierige, GC-reiche Konstrukte ist die Verwendung der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase zu bevorzugen. Hierbei enthält eine 50 µl Reaktion folgende Komponenten:

- < 250 ng Ausgangs-DNA
- 0,5 µM Primer A
- 0,5 µM Primer B
- 200 µM aller vier Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 10 µl Phusion GC-Puffer
- 1,5 µl 100% DMSO
- 0,5 µl Phusion DNA-Polymerase
- Wasser ad 50 µl

Die PCR erfolgt nach folgendem Programm:

1x	Denaturierung	98°C	30 sec
25x	Denaturierung	98°C	10 sec
	Anlagerung	T_m (Primer) – 3°C	20 sec
	Elongation	72°C	30 sec / kb Amplikon
	finale Elongation	72°C	10 min
	Lagerung	4°C	

Nach Beendigung einer PCR wird ihr Ergebnis im Agarosegel (3.1.1.1) kontrolliert. Nach erfolgreichem Verlauf ist das Amplikon als Bande mit bestimmter Fragmentlänge nachweisbar (modifiziert aus (105)).

3.1.3 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Muster innerhalb einer DNA und schneiden den Doppelstrang, wobei sie entweder bestimmte Überhänge („sticky end“) oder glatte Enden („blunt end“) generieren.

Typ II Restriktionsendonukleasen erkennen palindromisch angeordnete Zielsequenzen, sie schneiden spezifisch und meist innerhalb ihrer Erkennungssequenz. Es entstehen Fragmente mit charakteristischer Anzahl und Länge, welche im Agarosegel (3.1.1.1) nachgewiesen werden können und Aufschluss über das Vorkommen von Schnittstellen und somit auch über die DNA-Sequenz selber geben. Außerdem werden sie bei Klonierungen (3.1.5) eingesetzt. Eine Sonderform stellen die Typ II S Restriktionsenzyme dar, die eine definierte DNA-Sequenz binden und in einem festgelegten Abstand dazu schneiden; auf diese Weise lassen sich zwei DNA-Stücke

ligieren, ohne dass die Erkennungssequenz des Enzyms eingefügt wird und den Leserahmen zerstört oder zu Insertionen führt. Die Zahl der benötigten Einheiten Enzym hängen von der Menge der DNA und der Zahl ihrer Schnittstellen sowie vom verwendeten Enzym ab, meistens werden standardmäßig 3-10 Units Enzym eingesetzt. Für eine optimale Aktivität ist die Zugabe eines Puffers und gegebenenfalls auch von bovinem Serum-Albumin (BSA) erforderlich. Der enzymatische Verdau erfolgt bei 37°C, die Dauer richtet sich sowohl nach dem eventuellen Vorhandensein von Star-Aktivität (unspezifisches enzymatisches Schneiden der DNA bei langen Inkubationszeiten) und dem weiteren Verwendungszweck der DNA. Bei einem Kontrollverdau reichen Inkubationszeiten von ein bis zwei Stunden aus, eine weitere Verwendung der DNA-Fragmente in Klonierungen erfordert ein gründlicheres Schneiden und Inkubationszeiten bis zu 16 h (modifiziert aus (105)).

3.1.4 Reinigung von Nukleinsäuren

Die Reinigung von Nukleinsäuren ist zur Beseitigung von Enzymen, unerwünschten Fragmenten, nicht-inkorporierten Nukleotiden und nicht-kompatiblen Puffern erforderlich. Sie erfolgt im Anschluss an eine PCR, einen Verdau oder sonstigen enzymetische Reaktionen. Eine Gelaufreinigung wird bevorzugt verwendet, um aus einem Nukleinsäuregemisch Fragmente einer definierten Größe aufzureinigen. Für die Entfernung von Enzymen, Puffern, Nukleotiden und kürzeren Fragmenten ist eine PCR-Aufreinigung erforderlich, eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung beseitigt lediglich unerwünschte Enzyme und Puffer (modifiziert aus (105)).

3.1.4.1 Aufreinigung von DNA-Fragmenten durch präparative DNA Agarose-Gele

Die Elektrophorese durch präparative Agarose-Gele zur Aufreinigung von Nukleinsäure-Fragmenten läuft ab wie in 3.1.1.1 beschrieben. Nach dem Färben in Ethidiumbromid werden die gewünschten Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht und das Gelstück mit den Banden ausgeschnitten. Um Schädigungen und Verunreinigungen der DNA zu vermeiden, wird eine Glasscheibe als UV-Filter untergelegt und ein sauberes Skalpell verwendet. Die Extraktion der Nukleinsäure aus dem Gelstück erfolgt mit Hilfe des QIAEX®II Gel Extraction Kit von Qiagen und nach dem Protokoll des Herstellers mit allen empfohlenen Schritten (modifiziert aus (105)).

3.1.4.2 Aufreinigung von RNA-Fragmenten durch präparative RNA Polyacrylamid-Gele

Im Anschluss an eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.1.1.1) und SYBR Gold Färbung werden die gewünschten RNA-Banden analog zur Präparation von DNA

Fragmenten aus Agarosegelen ausgeschnitten. Um eine möglichst große Oberfläche zu erhalten, werden die Gelstücke durch eine 10 ml Spritze in ein 50 ml Falcon Reaktionsgefäß gedrückt. Die Gelfragmente werden mit RNase-freiem Wasser bedeckt und über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Im Anschluss wird die in Wasser gelöste RNA durch einen 0.45 µm Filter von Gelresten gereinigt und durch die Zugabe von 2,5 Volumen 100% Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH5 für 1h bei -80°C präzipitiert. Die Pelletierung erfolgt bei 2.680 g für 2 h.

3.1.4.3 Aufreinigung von RNA-Fragmenten durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Im Anschluss an eine enzymatische Reaktion kann RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt werden. Der RNA-Lösung wird 1 Volumen Roti-Phenol zugesetzt, für 30 sec stark geschüttelt und für 5 min bei 2.680 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird abgenommen und in 1 Volumen Chloroform für 30 sec geschüttelt und für 5 min bei 3.464 g zentrifugiert. Die RNA befindet sich in der oberen wässrigen Phase und wird mit 2,5 Volumen 100% Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH5 für 1 h bei -80°C präzipitiert und für 20 min bei 2.680 g pelletiert. Zur Beseitigung unerwünschter Salze wird die RNA in 75% EtOH gewaschen und für 20 min bei 2.680 g erneut pelletiert. Entsprechend der RNA-Menge wird diese in hochreinem Wasser gelöst und die Konzentration im NanoDrop gemessen (3.1.1.3).

3.1.4.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mit dem GeneJET PCR Purification Kit

Zur PCR-Aufreinigung kann das GeneJET PCR Purification Kit von Fermentas verwendet werden. Die Durchführung erfolgt nach Protokoll des Herstellers mit allen empfohlenen Schritten (modifiziert aus (105)).

3.1.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

Als Klonierung wird der Vorgang des Einführens eines DNA-Fragmentes (Insert) in ein Vektorplasmid bezeichnet. Mit Hilfe dieses Plasmides lässt sich die gewünschte DNA-Sequenz in Bakterienzellen transformieren und vermehren.

Das Insert kann sowohl ein PCR-Produkt als auch ein Abschnitt aus einem anderem Plasmid sein. Das zu klonierende Fragment und das Vektorplasmid werden mit identischen Restriktionsenzymen geschnitten oder mit solchen, die ligierbare Überhänge hinterlassen, danach werden sie nach 3.1.4.1 aufgereinigt (modifiziert aus (105)).

3.1.5.1 Dephosphorylierung geschnittener Vektorplasmide

Nach dem enzymatischen Verdau des Vektorplasmides werden dessen Enden mit shrimp alkaline phosphatase (SAP) dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors ohne Integration der gewünschten DNA-Sequenz zu verhindern. Der Dephosphorylierungsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Produkt des Enzymverdaus + 1 µl SAP	→	Inkubation	37°C 1h
		Inaktivierung	72°C 30 min
		Lagerung	4°C

3.1.5.2 Ligation von Inserts in ein Vektorplasmid

Die Ligation eines Inserts in ein Vektorplasmid bezeichnet die chemische Verknüpfung dieser beiden Fragmente durch eine Phosphorsäureesterbindung. Für eine optimale Effizienz werden zwischen 10 ng und 100 ng DNA pro Ansatz eingesetzt und ein Überschuss des Inserts gegenüber dem Vektor, damit dieses bevorzugt eingebaut wird.

Der Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Vektor
Insert (molares Verhältnis Insert : Vektor = 3:1)
1 Unit T4 DNA Ligase
2 µl 5x Ligase Puffer
Wasser ad 10 µl

Die Ligation erfolgt für 16 h bei 14°C.

Um die Reinheit der Ligationsansätze zu kontrollieren, werden außerdem zwei Kontrollen eingesetzt: Bei der Restriktionskontrolle wird dem Ligationsansatz keine Ligase zugegeben, um die Effizienz des vorangegangenen Restriktionsverdaus zu kontrollieren. Die Religationskontrolle ist für die Überprüfung der Dephosphorylierungseffizienz notwendig und enthält kein Insert (modifiziert aus (105)).

3.1.5.3 Ligation von Inserts in den pGEM T Easy Vektor

Produkte der Taq-Polymerase, welche grundsätzlich einen 3' A-Überhang hinterlässt, können ohne Restriktionsverdau in den pGEM T Easy Vektor von Promega ligiert und letztendlich mit einem Primer gegen den T7-Promotor sequenziert werden. Die Ligation

und anschließende Transformation in JM109 High Efficient Competent Cells oder NEB 10-beta Zellen erfolgt nach Protokoll des Herstellers.

3.1.5.4 Klonierung von Fragmenten mittels CloneJET PCR Cloning Kit

Produkte der Phusion-Polymerase haben glatte Enden und können in den pJET1.2/blunt Cloning Vector ligiert werden. Diese Klonierung ist nicht gerichtet, sodass das Insert sowohl in sense- als auch in antisense-Richtung vorliegen kann. Die Ligation erfolgt mit dem CloneJET PCR Cloning Kit von Fermentas und nach Protokoll des Herstellers.

3.1.6 Transformation von Plasmiden in kompetente Zellen

Durch ihre Transformation in kompetente Bakterienzellen lassen sich Plasmide vermehren und somit auch die in sie klonierte DNA-Sequenz (vergleiche 3.1.5). Die Selektion erfolgt über ein Antibiotikum (z.B. Ampicillin oder Kanamycin), gegen das die Plasmide ein Resistenzgen tragen. Während die transformierten Bakterien überleben, werden die Bakterien ohne Resistenzgen abgetötet (modifiziert aus (105)).

3.1.6.1 Transformation von Plasmiden in chemokompetente NEB 10-beta Zellen

Für gewöhnliche Transformationen werden chemokompetente NEB 10-beta Zellen verwendet. Die Transformation findet auf Eis mit anschließendem Hitzeschock in jeweils 25 µl NEB 10-beta Bakterienkultur statt. Zu der Bakterienkultur werden entweder 50 ng-500 ng DNA oder 2 µl Ligationsansatz (3.1.5) gegeben und durch leichtes Klopfen gemischt. Es schließt sich eine halbstündige Inkubation auf Eis an. Der Hitzeschock wird für exakt 30 sec bei exakt 42°C im Wasserbad durchgeführt. Nach weiteren 5 min auf Eis wird der Transformationsansatz mit 300 µl SOC-Medium in einer Vorkultur 60 min bei 37°C geschüttelt und dann auf einer LB-Agarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Das Wachsen der Klone erfolgt bei 37°C für 16 h (modifiziert aus (105)).

3.1.6.2 Transformation von Plasmiden in JM109 High Efficient Competent Cells

Für Transformationen nach Ligationen mit geringer zu erwartender Effizienz werden JM109 High Efficient Competent Cells von Promega verwendet, die Transformation erfolgt nach Protokoll des Herstellers.

3.1.6.3 Transformation von Plasmiden in BL21-Codon Plus Zellen

Zur T7 Promotor abhängigen Expression heterologer Proteine in E. coli werden BL21 - Codon Plus Zellen von Stratagene verwendet. Sie enthalten einen pET-T7 Vektor, dessen Expression durch einen IPTG-induzierbaren Promotor angeschaltet werden kann und im weiteren zur Expression des gewünschten Konstruktes führt.

In vorgekühlte 14 ml Falcon Rundboden-Reaktionsgefäße werden 50 µl BL21-Zellen und 1-50 ng Expressionsplasmid bzw. 1 µl Ligationsansatz pipettiert. Nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis wird der Hitzeschock für 20 sec bei 42°C durchgeführt. Nach einer zweiminütigen Ruhephase auf Eis werden 400 µl SOC-Medium zum Transformationsansatz gegeben und die Vorkultur wird für 1 h bei 37°C geschüttelt. Im Anschluss werden 100 µl Vorkultur auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Das Wachsen der Klone findet für 16 h bei 37°C statt.

3.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

3.1.7.1 Plasmidpräparation in kleinem Maßstab (Mini-Prep)

Von den Platten aus 3.1.6 werden einzelne Klone gepickt und in 5 ml LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin 16 h bei 37°C geschüttelt. Die Plasmidpräparation erfolgt aus 4,5 ml Bakterienkultur mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I nach Protokoll des Herstellers mit allen empfohlenen Schritten (modifiziert aus (105)).

3.1.7.2 Plasmidpräparation im großen Maßstab (Maxi-Prep)

Die Kultur für einen Maxi-Prep wächst in 100 ml LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin und wird mit 500 µl Mini-Prep-Kultur oder direkt mit dem Transformationsansatz angeimpft. Die Isolierung erfolgt mit dem Plasmid Maxi Kit von Qiagen und nach Protokoll des Herstellers (modifiziert aus (105)).

3.1.8 RNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen

3.1.8.1 RNA-Extraktion mittels TRIzol® Reagenz

Die Extraktion von RNA aus Säugerzellen erfolgt mittels TRIzol® Reagenz von Invitrogen nach Protokoll des Herstellers. Um Kontamination mit RNasen zu verhindern, werden alle Arbeitsschritte nach der Isopropanol-Präzipitation unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Zur Beseitigung unerwünschter DNA-Kontaminationen wird die RNA anschließend mit 1 µl (10 U) DNase I recombinant

RNase free pro 50 µg RNA für 15 min bei 37°C behandelt und anschließend mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (3.1.4.3) aufgereinigt.

3.1.8.2 RNA-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi

Alternativ zur TRIzol-Reagent basierten Extraktion kann auch die kostengünstigere RNA-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi durchgeführt werden (42). Die beiden Extraktionsmethoden funktionieren analog und nur während der Zelllyse werden unterschiedliche Schritte durchgeführt. Die konfluenten Zellen auf einer 145 mm Platte werden in 8 ml Lösung D gelöst und in ein 50 ml Falcon Reaktionsgefäß überführt. Es werden 0,8 ml 2 M Natriumacetat-Lösung (pH 4.0) hinzugegeben und die beiden Lösungen durch Vortexen gemischt. Es folgt die Zugabe von 8 ml wassergesättigtem Phenol und erneutem Vortexen. Im Anschluss können die Proben bei -80°C gelagert werden.

Zur Extraktion werden 0,4 ml Chloroform / Isoamylalkohol (49:1) pro 1 ml Lösung D zu den Proben gegeben, diese 30 sec mit der Hand geschüttelt und 15 min auf Eis gekühlt. Die Phasentrennung erfolgt für 30 min bei 2.680 g und 4°C. Die RNA-haltige wässrige Phase wird abgenommen und in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt, es folgt die Zugabe von 1 ml Isopropanol / 1 ml Lösung D und ein Mischen durch Invertieren. Die RNA wird für 10 min bei RT präzipitiert und für 45 min bei 2.680 g und 4°C gefällt. Zur Beseitigung unerwünschter Salze wird die RNA in 75% EtOH gewaschen und für 20 min bei 2.680 g gefällt. Entsprechend der RNA-Menge wird diese in hochreinem Wasser gelöst und die Konzentration im NanoDrop gemessen. Zur Beseitigung unverwünschter DNA-Kontaminationen wird die RNA anschließend mit 1 µl (10 U) DNase I recombinant RNase free pro 50 µg RNA für 15 min bei 37°C behandelt und anschließend mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (3.1.4.3) aufgereinigt.

3.1.9 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

In einer RT-PCR wird die RNA durch eine Reverse Transkriptase aus dem Moloney Murine Leukemia Virus zu einer einzelsträngigen DNA umgeschrieben. Als Primer kann bei bekannter Sequenz ein genspezifischer Primer verwendet werden, bei mRNAs ein Poly T-Primer und bei unbekanntem 3' Ende ein random hexamer Primermix.

Die Reverse Transkription wird mit dem RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas wie folgt durchgeführt:

	1 µg	RNA	
	1 µl	RT-Primer (10 µM Stockkonzentration)	
		Wasser ad 6 µl	5 min 65°C
Zugabe von:	2 µl	10x Puffer RT	
	1 µl	dNTP Mix (10 mM Stockkonzentration)	
	0,5 µl	RNase inhibitor	
	0,5 µl	Revert Aid RT	

Die Reverse Transkription erfolgt für 60 min bei 42°C oder bei Verwendung von Primern mit niedriger Schmelztemperatur für 30 min bei 16°C und anschließenden 30 min bei 42°C. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgt für 5 min bei 85°C. Im Anschluss daran können die PCR-Produkte bei -20°C eingefroren oder direkt in einer qPCR eingesetzt werden.

3.1.10 Quantitative PCR (qPCR)

Die qPCR dient dem spezifischen Nachweis und der Konzentrationsbestimmung bestimmter RNA-Sequenzen. Die Quantifizierung dieser Sequenzen als Genomäquivalente (GE) erfolgt mittels Messung der Extinktion von in Doppelstrang-DNA inkorporiertem SYBR Green und der Eichung auf eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen.

Der Ansatz der qPCR mit dem ABSolute qPCR Sybr Green Mix von Thermo Scientific setzt sich zusammen wie folgt:

2 µl	Template (RT-PCR Produkt, 1:3 verdünnt)
12,5 µl	2x SYBR Green MM
3,75 µl	forward Primer (10 µM Stockkonzentration)
1,8 µl	reverse Primer (10 µM Stockkonzentration)
	Wasser ad 25 µl

Das qPCR-Programm wird von einem MJ Mini™ Thermal Cycler von BioRad mittels der Opticon Monitor™ Software durchgeführt und setzt sich wie folgt zusammen:

Taq-Aktivierung	1 x	95°C	15 min
Amplifikation	40 x	{ 95°C 60°C	{ 15 sec 60 sec

56

Nach Ablauf der qPCR errechnet das Programm anhand der Standardreihe die genauen Konzentrationen der Sequenzen. Die Ergebnisse lassen sich in ein Excel-File exportieren und weiter auswerten (modifiziert aus (105)).

3.2 Methoden zur Analyse und Modifikation von RNA

3.2.1 In vitro Transkription (IVT)

Die in vitro Transkription dient der spezifischen Synthese eines RNA-Fragmentes anhand einer doppelsträngigen Ausgangs-DNA. Hierzu werden die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T7 und SP6 verwendet. Die zu transkribierenden DNA-Stücke werden als komplementäre Einzelstränge mit den jeweiligen Promotorsequenzen bestellt, in HBS zu 100 pmol / μ l resuspendiert, für 2 min 90°C denaturiert und durch anschließendes langsames herunterkühlen auf 25°C zu einem Doppelstrang zusammengelagert. Die in vitro Transkription erfolgt mit dem AmpliScribe™ High Yield Transcription Kits von Epicentre nach Protokoll des Herstellers. Um eine Immunstimulation durch verbleibende Ausgangs-DNA zu vermeiden, wird diese nach Ablauf der in vitro Transkription mit DNA I verdaut. Die Proben werden mit Micro Bio-Spin® Columns von Bio-Rad aufgereinigt.

3.2.2 Hydrolyse von RNA mittels RNasen

Die Hydrolyse zellulärer RNA mittels RNasen dient in dieser Arbeit in erster Linie der Generierung immunstimulatorischer Komponenten oder deren Beseitigung. Hierzu werden einzelstrangspezifische RNase A und doppelstrangspezifische RNase III verwendet. Die Integrität der verwendeten RNA wird im Vorfeld mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.1.1.1) sichergestellt.

Für den RNase-A Verdau werden $2,5 \cdot 10^{-5}$ U RNase A/ μ g RNA in HBS für 1 h bei 37°C inkubiert. Der RNase III-Verdau findet mit $2,5 \cdot 10^{-2}$ U RNase III / μ g RNA in RNase III-Puffer mit 0,5 mM frisch zusetztem DTT für 1 h bei 37°C statt. Im Anschluss an den Verdau werden die RNA-Fragmente mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (3.1.4.3) aufgereinigt.

3.2.3 Fragmentierung von RNA mittels Zinkhydrolyse

Ambion ® RNA Fragmentation Reagents dienen der RNasen-unabhängigen Fragmentierung von RNA. Die Hydrolyse ist Zink-vermittelt und generiert Fragmente von 60-200 nt Länge.

Der Fragmentierung findet nach folgendem Protokoll statt:

50 µg	RNA	
10 µl	Fragmentation Buffer	
Wasser ad 100 µl		80 min 70°C

Im Anschluss erfolgt die Zugabe von 10 µl Stop Solution und die Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (3.1.4.3).

3.2.4 Fragmentierung von RNA mittels Bleihydrolyse

Die Bleihydrolyse dient ebenfalls der RNasen-unabhängigen Fragmentierung von RNA und wird wie folgt durchgeführt:

50 µg	RNA	
10 µl	PbAc (100 mM)	
1x HBS ad 50 µl		60 min 37°C

Im Anschluss werden die Proben durch Phenol-Chloroform-Extraktion (3.1.4.3) aufgereinigt.

3.2.5 Fragmentierung von RNA mittels Ultraschall-Behandlung

Behandlung mit Ultraschallwellen führt zu Doppelstrangbrüchen in RNA und somit zu deren Fragmentierung. Hierzu wird RNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl für 3 mal 15 s mit 7 Zyklen Ultraschallwellen behandelt. Im Anschluss erfolgt eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung (3.1.4.3).

3.2.6 5' Phosphorylierung von RNA mittels PNK

Polynukletid-Kinase (PNK) monophosphoryliert 5' Enden von Nukleinsäuren. 300 pmol Nukleinsäure werden mit 5 µl T4 PNK 10x Puffer, 1 mM ATP, Wasser ad 50 µl und 1 µl PNK (10 U) für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgt eine Hitzeinaktivierung bei 65°C für 20 min oder eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung (3.1.4.3).

3.2.7 Dephosphorylierung von RNA mittels CIP

Calf intestine phosphatase (CIP) dephosphoryliert 3' und 5' Enden von Nukleinsäuren. Bei Fragmenten mit etwa 50 nt Länge werden 10 µg RNA und 1 µl CIP (10 U) in 1x NEBuffer 3 für 1 h bei 37°C inkubiert. Da CIP nicht hitzeinaktiviert werden kann,

muss anschließend eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung (3.1.4.3) durchgeführt werden.

3.2.8 Auftrennung der RNA-Fragmente mittels NucleoBond RNA/ DNA 400 Säulen

Mit NucleoBond-Säulen von MACHEREY-NAGEL kann ein Gemisch aus verschiedenen langen RNA-Fragmenten anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Dieses Silica-basierte System beruht auf den Prinzipien der Anionen-Austausch-Chromatographie, die Fragmente werden anhand steigender Kaliumchlorid-Konzentrationen eluiert.

Um die Probe an die Säule zu binden, werden 400 µg RNA in 8 ml R0-Puffer gemischt und auf die Säule gegeben. Nachdem sich die Säule durch den Gravitations-vermittelten Durchfluss geleert hat, werden die nachfolgenden Waschschrirte wie in Tabelle 5 beschrieben mit jeweils 12 ml Puffer durchgeführt.

Puffer	KCl-Konzentration [mM]	Funktion
R0	0	Binden der RNA an die Säule
R1	400	Waschschritt
A	650	Elution Fraktion A (≤ 44 bp)
B	733	Elution Fraktion B (≤ 63 bp)
C	850	Elution Fraktion C (≤ 75 bp)

Tabelle 5: Waschschrirte der NucleoBond-Säulen.

Die erwünschten Fraktionen werden in einem Falcon-Reaktionsgefäß gesammelt, die RNA wird mit $\frac{3}{4}$ Volumen Isopropanol für 20 min auf Eis präzipitiert. Im Anschluss erfolgt eine mindestens zweistündige Pelletierung bei 2.680 g und 4°C. Der Überstand wird verworfen, die RNA in 75% Ethanol pelletiert und anschließend in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Die Säule kann im Anschluss mit N5-Puffer gewaschen und wieder verwendet werden.

3.2.9 Annealing komplementärer RNA-Fragmente

Zwei einzelsträngig vorliegende komplementäre RNA-Stücke können unter geeigneten Pufferbedingungen zu Doppelsträngen annealt werden. Bei Fragmenten ohne Selbst-Komplementarität kann das Zusammenlagern in 1x HBS erfolgen. Wenn die Einzelstränge zur Bildung von Haarnadel-Strukturen neigen, empfiehlt sich die Verwendung des Annealing-Puffer nach Metabion. Je 15 µl der beiden 100 µM RNA-Oligonukleotiden werden vereinigt und mit Annealing-Puffer ad 75 µl aufgefüllt. Die

Lösung wird für 2 min bei 90°C im Heizblock denaturiert und dann im abgeschalteten Heizblock über die Dauer von 1 h auf Raumtemperatur abgekühlt.

3.2.10 stem-loop qRT-PCR

Anhand der stem-loop qRT-PCR nach Chen (37) können auch kurze RNA-Fragmente von mindestens 20 nt Länge wie zum Beispiel microRNAs spezifisch quantifiziert werden. Der RT-Primer (stem-loop Primer) bildet wie in Abbildung 7 gezeigt eine Haarnadelstruktur, diese verhindert aufgrund sterischer Inhibition die Anlagerung an RNA-Fragmente mit zusätzlichen 3' Nukleotiden. Die letzten 6 Nukleotide am 3' Ende des RT-Primers überlappen mit dem 3' Ende der RNA. Während der reversen Transkription wird ein RNA-spezifischer Vorwärtsprimer und ein RT-Primer spezifischer Rückwärtsprimer eingesetzt. Auf diese Weise überlappen die Primer nicht einmal bei der Amplifikation sehr kurzer RNA-Fragmente, was ein spezifisches Signal in der Real-Time PCR gewährleistet.

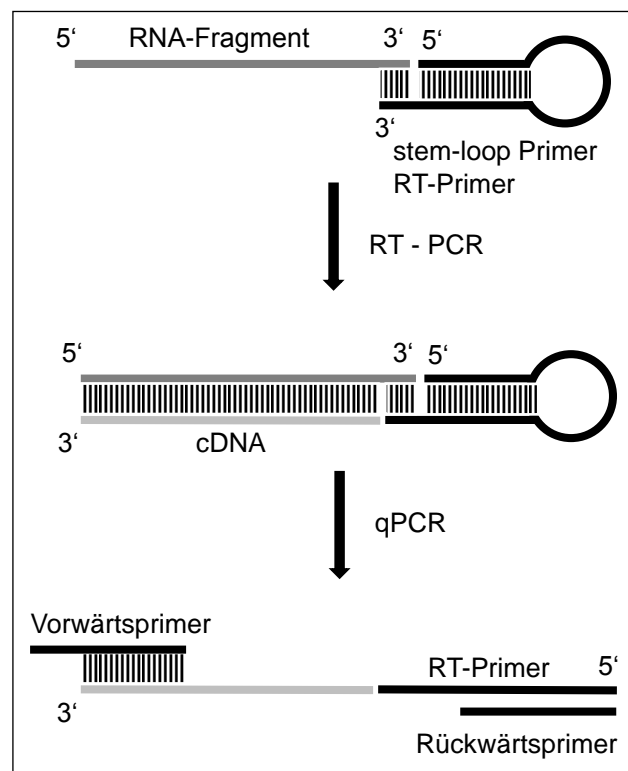


Abbildung 7: Funktionsweise der stem-loop PCR.

Die quantitative Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR) wird durchgeführt wie unter 3.1.10 beschrieben.

3.2.11 Klonierung von RNA-Fragmenten unbekannter Sequenz mittels Adapterligation

Zur Klonierung und Sequenzierung von microRNAs wurde von Hafner et al (81) ein Protokoll etabliert, das die spezifischen Eigenschaften von microRNAs ausnutzt. Zuerst wird ein 5' phosphorylierter Adapter an das 3' Hydroxy-Ende der microRNA ligiert, dann das 5' Phosphat der microRNA an das 3' Hydroxy-Ende eines zweiten Adapters. Da Produkte eines RNase-Verdaus im Gegensatz zu microRNAs 3' phosphoryliert und 5' hydroxyliert sind, wurde das Protokoll modifiziert und die zu klonierenden Fragmente wie in Abbildung 8 veranschaulicht mit Calf Intestine Phosphatase (CIP) 3' dephosphoryliert und mit Polynukleotid-Kinase (PNK) 5' phosphoryliert. Um einen Verlust gering konzentrierter RNA-Spezies zu vermeiden, werden low retention Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwendet.

Nach Extraktion der Fragmente aus präparativen PAA-Gelen (3.1.4) findet die Dephosphorylierung statt. Hierzu werden etwa 2,5 µg RNA in 100 µl 1xNEBuffer 3 mit 10 U CIP für 1h bei 37°C inkubiert. Da CIP nicht hitzeinaktiviert werden kann, erfolgt im Anschluss eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung (3.1.4.3) und Aufnahme des RNA-Pellets in 11 µl hochreinem Wasser, bevor die 3' Ligation stattfindet.

11 µl	RNA
3 µl	10 µM 3' Adapter
3 µl	100% DMSO
2 µl	10x RNA Ligase Puffer

werden für 30 sec bei 90°C im Heizblock denaturiert. Daraufhin wird die RNA sofort auf Eis gestellt und nach 20 sec wird 1 µl (10 U) T4 RNA Ligase zugegeben.

Die Ligation erfolgt für 16 h bei 0-4°C auf Eis und im Kühlraum. Zur Beseitigung von unligiertem 3' Adapter wird eine Präparative PAA-Gelelektrophorese (3.1.4.2) durchgeführt, wobei nur die RNA-Adapterligation ausgeschnitten und über Nacht extrahiert wird. Das Volumen der niedrig konzentrierten RNA-Lösung wird in der Speed-Vac verkleinert. Im Anschluss erfolgt eine 5' Phosphorylierung der RNA in einer PNK forward reaction:

10 µl	RNA	
1,5 µl	Reaction Buffer A	
1 µl	ATP (10 µM)	
2 µl	T4 PNK (10 U)	1 h bei 37°C

Da der Reaction Buffer A mit der T4 Ligase kompatibel ist, erfolgt im Anschluss nur eine Inaktivierung der PNK bei 75°C für 10 min, dann kann direkt eine 5' Adapterligation durchgeführt werden.

15 µl PNK fw reaction
 2,5 µl 10x Ligase Puffer
 6 µl 100% DMSO
 11,5 µl Reinstwasser
 5 µl 10 µM 5' Adapter

werden für 30 sec bei 90°C im Heizblock denaturiert. Daraufhin wird die RNA sofort auf Eis gestellt und nach 20 sec wird 1 µl (10 U) T4 RNA Ligase zugegeben. Die Ligation erfolgt für 1 h bei 37°C. Nach der Ligation kann die RT-PCR (3.1.9) mit 3' Primer als RT-Primer durchgeführt werden. Es folgt die Hydrolyse der RNA mit 1 µl RNase H pro Reaktionsansatz für 20 min bei 37°C. Nach einer anschließenden PCR-Amplifikation (3.1.2) wird das PCR-Produkt durch präparative Agarose-Gelelektrophorese (3.1.4.1) aufgereinigt, um den Anteil versehendlich entstandener Adapterligationen zu minimieren. Nach erneuter PCR-Amplifikation kann das Produkt mittels TOPO-TA Klonierung in einen pGEM T Easy Vektor ligiert (3.1.5.3) und in JM109 Zellen transformiert (3.1.6.2) werden. Einzelne Klone werden gepickt, die Plasmid-DNA in kleinem Maßstab präpariert (3.1.7.1) und sequenziert (3.1.1.2).

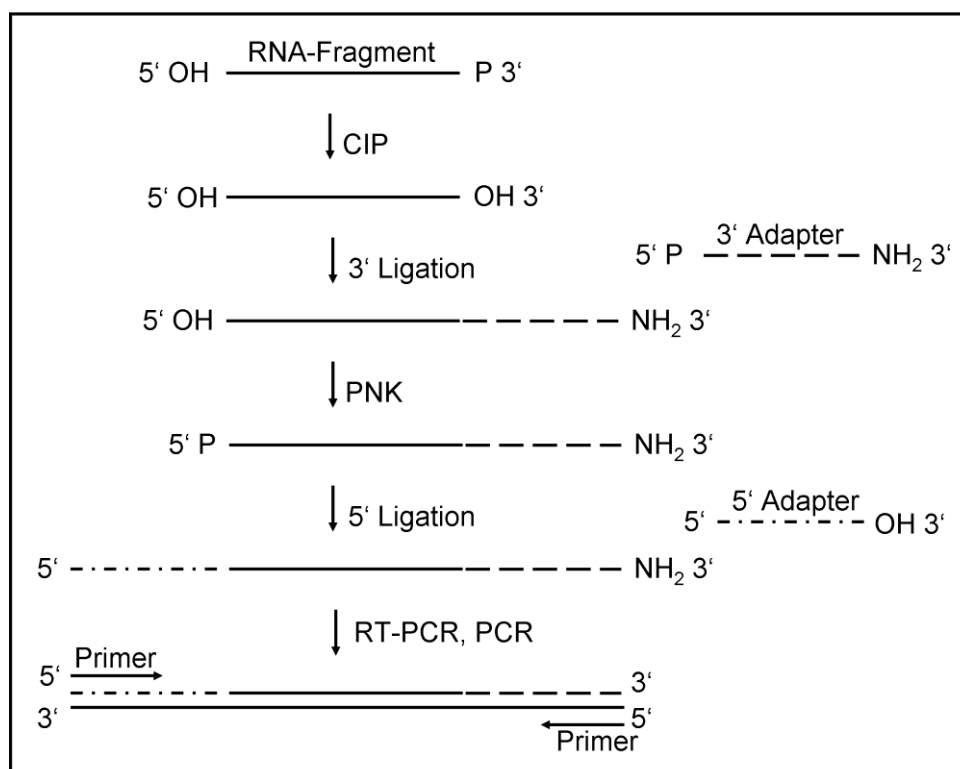


Abbildung 8: Funktionsweise der Klonierung durch Adapterligation nach Hafner.

3.2.12 Ion Torrent

Ion Torrent gehört zur Methodengruppe des Next Generation Sequencing (NGS) und liefert mehrere Hunderttausend Sequenzen pro Lauf und Probe. Auf diese Weise lassen sich sowohl die Zusammensetzung eines Nukleinsäuregemischs als auch seltene Sequenzen erfassen. Die Methode ermöglicht eine Sequenzierung von DNA während diese synthetisiert wird (sequencing by synthesis) und benötigt lediglich bekannte Adaptersequenzen an den Enden.

Die zu sequenzierenden Proben werden mit NucleoBond-Säulen von MACHEREY-NAGEL aus einem Gemisch von RNase A bzw. RNase A/III-verdauter HEK-RNA aufgereinigt. Dies erfolgt wie in 3.2.8 beschrieben, allerdings wird zur besseren Reinheit der Proben der Waschschrift mit Puffer A zweimal hintereinander durchgeführt. Die durch Puffer B und C eluierten Proben werden gepoolt und gefällt. Um eine Ligation der Adapter zu ermöglichen, werden die RNA-Fragmente zuerst mit CIP 3' dephosphoryliert (3.2.7) und dann mit PNK 5' phosphoryliert (3.2.6). Die stimulatorischen Eigenschaften werden in einer Immunstimulation (3.3.7) sichergestellt und das Bandenmuster durch PAA-Gelelektrophorese (3.1.1.1) kontrolliert.

Die Generierung der small RNA Transkriptom Library, die Sequenzierung und die bioinformatische Auswertung wurden von der Firma CeGaT in Tübingen durchgeführt. Zum Zusammenstellen der einzelnen Sequenzen (mapped count) wurde humane 45s rRNA (NCBI Reference Sequence: NR_046235.1) als Referenzsequenz verwendet.

3.2.13 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ("High Performance Liquid Chromatographie", HPLC) wird als chromatographisches Analyseverfahren zur Trennung von Substanzen verwendet, die anschließend über Standards quantifiziert und identifiziert werden. Hierbei werden die zu untersuchenden Substanzen in ein Laufmittel (mobile Phase) gegeben und über eine Trennsäule (stationäre Phase) getrennt. Die Verweildauer der zu untersuchenden Substanzen auf der Säule hängt von ihrer Wechselwirkung mit der stationären Phase ab: Moleküle mit starken Wechselwirkungen verbleiben länger auf der Säule als Moleküle mit schwächeren Wechselwirkungen. Dies hat unterschiedliche Retentionszeiten zur Folge, zu denen die Substanzen am Ende der Säule erscheinen und mit einem Detektor nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde die HPLC zur Analyse von RNA-Modifikationen verwendet. Hierzu müssen die RNA-Oligos in einzelne Nukleoside gespalten werden. 10 µg RNA werden in 40 mM Ammoniumacetat mit 3 mM Zinkchlorid aufgenommen und mit 2,5 U Nuklease P1 für 16h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden den

Proben TRIS-HCl zu einer Endkonzentration von 15 mM und Magnesiumacetat zu einer Endkonzentration von 1,5 mM zugesetzt. Die Dephosphorylierung der Nukleotide erfolgt mit 0,25 U Shrimp Alkaline Phosphatase / μg RNA und 0,1 mU Snake Venom Phosphatase / μg RNA für 2 h bei 37°C. Anschließend werden die Proben für 10 min bei 30.000 g zentrifugiert und die Überstände geerntet. Die Analyse erfolgt auf einem Dionex Ultimate 3000 System mit einer SUPELCOSIL LC18 (4*2 mm) reverse Phase Säule. Die polare mobile Phase besteht aus Eluent A (5 mM Ammoniumacetat, pH 6.0), in der die Nucleoside auf die Säule gespült wird. Die Elution erfolgt über graduelle Beimischung des Eluent B (40% Acetonitril) innerhalb von 66 Minuten mit einer Durchflussrate von 0.85 ml/min auf 60%. Der Nachweis der Nukleoside erfolgt durch Messung der Extinktion bei 254 nm.

3.3 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden verschiedenste immortalisierte Zelllinien für Zellkultur-experimente und die Extraktion von RNA verwendet. Die Besonderheiten dieser Zelllinien und ihre Mediumansprüche sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Zelllinien werden in Zellkulturflaschen im entsprechenden Medium mit 2 mM L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin (P/S) im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

Name	Medium	FCS-Gehalt
A549	DMEM	10%
HEK 293	DMEM	10%
HeLa	RPMI	5%
Huh7	DMEM	10%
Huh7.5	DMEM	10%
MDCK	RPMI	5%
Vero	RPMI	5%

Tabelle 6: Medianaanforderungen der verwendeten Zelllinien.

In Abhängigkeit von der Puffereigenschaft des Mediums werden Zelllinien in DMEM bei 7,5% CO₂, Zellen in RPMI bei 5% CO₂ inkubiert. Die Passage der Zelllinien findet alle 3 bis 4 Tage bei einer Konfluenz von 90% statt. Hierzu wird das Medium abgenommen, die Zellen in etwa 10 ml PBS_{def} gewaschen und dann mit etwa 5 ml Trypsin/EDTA überspült. Das Trypsin wird abgenommen und die Zellen bei 37°C inkubiert bis sich der Zellrasen ablöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von Medium mit FCS abgestoppt und restliches Trypsin durch Zentrifugation für 7 min bei 300 g und 4°C und Verwerfen des Überstandes beseitigt. Die Zellen werden je nach Teilungsrate im Verhältnis 1:4

bis 1:12 gesplittet und mit frischem Kulturmedium in eine frische Zellkulturflasche überführt, sodass sie beim nächsten Umsetzen wieder zu 90% konfluent sind.

3.3.1 Kultivierung von murinen Makrophagen

Die gezielte Differenzierung muriner Knochenmarkszellen ermöglicht die spezifische Untersuchung bestimmter Zelltypen und Gene. Knochenmarkszellen werden wie in 3.6 beschrieben präpariert. An Tag 0 werden 5×10^6 Zellen in einer 10 cm Kulturschale (Becton 353003) in 10 ml RPMI_{complete} (10% FCS, 100 Units/ml Penicillin und 10 µg/ml Streptomycin (P/S), 2 mM Glutamin, 50 µM β-Mercaptoethanol) mit 20 ng/ml M-CSF ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. An Tag 3 werden den Kulturen erneut 20 ng/ml M-CSF hinzugesetzt. Die Zellernte erfolgt an Tag 5. Das Medium wird abgesaugt und die adhärennten Makrophagen durch Inkubation mit 5 ml PBS_{def} mit 3% FCS und 2 mM EDTA für 15 min bei 37°C abgelöst. Die Zellen werden mit einer 1 ml Pipette von dem Boden der Platte abgespült, in ein 50 ml Falcon überführt und für 7 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in RPMI_{complete} aufgenommen. Die Differenzierung der Zellen wird über Durchflusszytometrie (3.4.2) mit Antikörpern gegen F4/80, MHCI und CD11b kontrolliert.

3.3.2 Kultivierung von murinen mDCs

An Tag 0 werden nach Präparation des Knochenmarks (3.6) 6×10^6 Zellen in einer 10 cm Kulturschale (Nuclon-Surface) in 10 ml RPMI_{complete} (10% FCS, 100 Units/ml Penicillin und 10 µg/ml Streptomycin (P/S), 2 mM Glutamin, 50 µM β-Mercaptoethanol) mit 15% GM-CSF-haltigem Zellkulturüberstand ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Hierbei ist besonders darauf zu achten, dass die Zellen nicht erschüttert werden. An Tag 3 und 6 werden den Zellen erneut 10 ml RPMI_{complete} mit 15 % GM-CSF zugesetzt. Die Ernte der nicht-adhärennten Zellen erfolgt an Tag 7, indem das Medium vorsichtig mit einer 10 ml Pipette abgenommen, in ein 50 ml Falcon überführt und für 7 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert wird. Das Zellpellet wird in RPMI_{complete} aufgenommen. Um die Differenzierung der Zellen im Durchflusszytometer zu kontrollieren, werden die mDC-Marker CD11c und MHCII gefärbt, der Prozentsatz der lebenden Zellen kann über eine TO-PRO Färbung bestimmt werden (3.4.2).

3.3.3 Kultivierung von murinen pDCs

Nach Präparation des Knochenmarks (3.6) an Tag 0 werden $1,5 \times 10^7$ Zellen in einer 10 cm Primaria-Kulturschale in 10 ml Opti-MEM_{complete} (1% FCS, 100 Units/ml Penicillin und 10 µg/ml Streptomycin (P/S), 50 µM β-Mercaptoethanol) mit 35 ng/ml Flt3-Ligand (Zellkulturüberstand 1:250) ausgesät und für 7 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die nicht-adhärennten Zellen werden an Tag 7 geerntet, indem das Medium

mit einer 10 ml Pipette abgenommen und in ein 50 ml Falcon überführt wird. Die Zellen werden bei einer Zentrifugation für 7 min bei 300 g und 4°C pelletiert und in Opti-MEM_{complete} aufgenommen. Die Differenzierung wird am Durchflusszytometer (3.4.2) über die pDC-Marker B220 und CD11c kontrolliert.

3.3.4 Kultivierung humaner PBMCs

Nach der Isolation aus Buffy coats (3.3.5) werden jeweils $2 \cdot 10^7$ humane PBMCs in 40 ml RPMI mit 10% FCS, 100 Units/ml Penicillin und 10 µg/ml Streptomycin (P/S), 2 mM Glutamin, Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat in eine 175 cm² Zellkulturflasche überführt. Um eine Proliferation der Zellen auszulösen, werden außerdem 750 ng/ml Phytohämagglutinin (PHA) hinzugegeben. Die Zellkulturflasche samt Inhalt wird aufrecht stehend in einem 37°C Zellkultur-Inkubator mit einem 5%igen CO₂-Gehalt für etwa fünf Tage inkubiert. Die Ernte der Zellen durch Pelletieren aus dem Überstand und Aufnahme in Trizol mit anschließende RNA-Extraktion (3.1.8) erfolgen, wenn sich die Proliferation der PBMCs deutlich durch die Bildung frei schwimmender „maulbeerartiger“ Zellcluster zeigt.

3.3.5 Isolation primärer humaner Immunzellen aus Buffy coats

Durch Gradientenzentrifugation können humane primäre Immunzellen (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) aus Spenderblut aufgereinigt werden. Auf diese Weise erhält man ein Gemisch aus Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Dendritischen Zellen, welches dann beispielsweise in Stimulationsexperimenten (3.3.7) eingesetzt werden kann. 13 ml Ficoll werden in Falcon gegeben, mit 25 ml Spenderblut vorsichtig überschichtet und für 30 min bei 670 g und 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Da Ficoll eine Dichte von 1,077 g/ml hat und somit leichter als Erythrozyten aber schwerer als PBMCs ist, bildet sich ein Gradient wie in Abbildung 9 dargestellt aus.

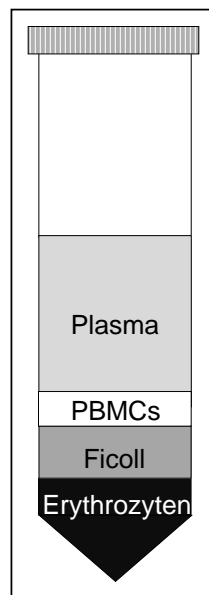


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Ficollgradienten.

Die weiße Phase der PBMCs zwischen Plasma und Ficoll wird mit einer 10 ml Pipette entnommen und in ein frisches Falconröhrchen überführt. Die Zellen werden zweimalig gewaschen, indem 4°C kaltes PBS_{def} ad 50 ml hinzugegeben wird, die Röhrchen für 7 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen wird. Im Anschluss werden die Zellen in RPMI mit 100 Units/ml Penicillin und 10 µg/ml Streptomycin (P/S), 2 mM Glutamin, Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat resuspendiert. Das Medium wird außerdem mit 4%igem Serum AB-positiver männlicher Spender komplettiert.

3.3.6 Separation humaner Monozyten durch Elutriation

Nachdem PBMCs über einen Ficoll-Gradienten von Erythrozyten und Granulozyten getrennt worden sind, können sie über die höhere Auflösung der zentrifugalen Elutriation weiter in ihre einzelnen Zellbestandteile aufgetrennt werden. Auf diese Weise können aus einer PBMC-Fraktion u.a. die Monozyten isoliert werden. Zu diesem Zweck wird ein spezieller Rotor mit einer trapezförmigen Separationskammer in die Zentrifuge eingesetzt. Über ein Schlauchsystem ist diese Kammer an eine Pumpe angeschlossen. Über diese wird die Zellsuspension zu Beginn der Zentrifugation in die Kammer eingelassen. Am entgegengesetzten Ende der Kammer werden die separierten Fraktionen über einen Abflussschlauch ausgespült und können aufgefangen werden. Eine Sedimentation der Zellen durch die konstante Zentrifugalkraft wird durch den kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom in entgegengesetzter Richtung (Zentripetalkraft) durch die Pumpe verhindert. In Abhängigkeit von ihrer Größe und Dichte wandern die Zellen in der Kammer in die entsprechende Zone, in der ein Gleichgewicht herrscht zwischen Zentrifugalkraft, Zentripetalkraft und ihrer jeweiligen Sedimentationsrate.

Es besteht folgender Zusammenhang zwischen Rotordrehzahl und Flüssigkeitsrate:

$$F = X * D^2 * (RPM * 10^{-3})^2$$

F = Flüssigkeitsrate in ml/min

X = Kammerfaktor (0,0511)

D = Zelldurchmesser in μm

RPM = Rotordrehzahl pro Minute

Durch schrittweise Erhöhung der Pumpleistung (Erhöhung der Zentripedalkraft) können die aufgetrennten Zellen entsprechend ihrer Größe aus der Kammer gespült werden.

Das Einspülen der PBMC-Lösung (3.3.5) erfolgt bei einer Pumpleistung von 6 ml/min, bevor die Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums schrittweise erhöht wird. Zuerst werden Thrombozyten und Erythrozyten aus der Kammer gespült, dann Lymphozyten und NK-Zellen. Das Ausspülen der erwünschten Monozytenfraktion in 100 ml Elutriationsmedium erfolgt bei einer Pumpleistung von 36 ml/min. Diese Zellen wurden aufgefangen, bei 300 g für 7 min bei 4°C herunterzentrifugiert und dann in RPMI_{complete} aufgenommen. Anschließend konnten sie zur Immunstimulation (3.3.7, 3.3.11) verwendet werden.

3.3.7 Immunstimulationen durch Nukleinsäuren mittels Lipofectamin2000

Durch die Transfektion von Nukleinsäuren in Zellen lassen sich Aussagen zu deren potentiell stimulatorischen Eigenschaften und den dafür verantwortlichen Rezeptoren der angeborenen Immunität treffen. Die Quantifikation dieser stimulatorischen Eigenschaften erfolgt durch die Messungen von Interferon- und Zytokinproduktionen. Um potentielle Liganden der RLRs zu identifizieren, wird Lipofectamin2000 als Transfektionsreagenz verwendet.

Für gewöhnlich wird eine Immunstimulation in einer 96-well-Platte in Duplikaten durchgeführt. Die Stimuli werden in 25 μl Opti-MEM / well in einem Eppendorfgefäß vorverdünnt, die optimale Endkonzentration im well liegt erfahrungsgemäß zwischen 0,4 und 10 ng/ μl . Zur Kontrolle der Rezeptorfunktionalitäten werden Stimuli mit bekannten Eigenschaften (dargestellt in Tabelle 7) eingesetzt.

Stimuli	Endkonzentration ng/ μl	Rezeptor	Transfektions- reagenzium
CpG 2216	1	TLR9	nein
LPS	0,1 (humane Zellen)	TLR2/4	nein

	1 (murine Zellen)		
Poly I:C	2	RIG I, MDA5, TLR3	Lipofectamin
R848	1	TLR7, TLR8	Lipofectamin
RIG I Ligand	1	RIG I	Lipofectamin
RNA40	5	TLR7, TLR8	Lipofectamin Dotap
RNA63	5	TLR7, TLR8	Dotap

Tabelle 7: Rezeptorspezifität der Kontrollstimuli.

Den verdünnten Stimuli werden 25 µl / well einer Lipofectamin-Verdünnung (siehe Tabelle 8) in Opti-MEM zugesetzt und die Mischungen für 5 min bei 20°C inkubiert. Anschließend werden sie mit zellspezifischen Medium ad 100 µl / well aufgefüllt und zu den in der Zwischenzeit ausgesäten Zellen hinzugegeben. Die Inkubation erfolgt für 18 h bei 37°C und dem mediumspezifischen CO₂-Gehalt. Im Anschluss können die Überstände geerntet und im ELISA (3.4.1) eingesetzt, aus den Zellen RNA für eine qRT-PCR (3.1.9, 3.1.10) extrahiert, die Reportergenexpression in einem Luciferaseassay bestimmt (3.3.10) oder die Überlebensraten der Zellen durch einen MTT-Assay (3.3.13) ermittelt werden.

Die optimalen Zellzahlen und Lipofectaminmengen pro well sowie der geeignete Readout hängen jeweils von den individuellen Zelltypen ab und sind in Tabelle 8 dargestellt. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass bei anderen Versuchsansätzen und Stimuli andere Bedingungen erforderlich sein können.

Zellen	Zellen / well	µl Lipofectamin / well	Readout
A549 Zellen	2,8 x 10 ⁴	1	RANTES und IP10 (ELISA); IFN-β und ISG56 (qRT-PCR)
HEK-RIG I Zellen	10 ⁵	0,5	Firefly-Luciferase
Huh7.5 Zellen (12 well Platte)	4*10 ⁵	10	IFN-β und ISG56 (qRT-PCR)
humane Monozyten	1 x 10 ⁵	0,5	IFN-α und IL6 (ELISA)
humane PBMCs	3 x 10 ⁵	0,5	IFN-α und IL6 (ELISA)
murine Makrophagen	2 x 10 ⁵	0,5	IFN-α und IL6 (ELISA)
murine mDCs	2 x 10 ⁵	0,2	IFN-α und IL6 (ELISA)
murine pDCs	2 x 10 ⁵	0,2	IFN-α und IL6 (ELISA)

Tabelle 8: Stimulationsbedingungen verschiedener Zelllinien in einer Lipofectamin2000-Stimulation.

3.3.8 Immunstimulationen durch Nukleinsäuren mittels Dotap

Um die Eigenschaften potentieller TLR-Liganden zu untersuchen, wird bevorzugt Dotap als Transfektionsreagenzium verwendet. Die Stimulation erfolgt analog zu 3.3.7. Die verwendeten Zelllinien und die benötigte Menge Dotap pro well sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Zellen	Zellen / well	µl Dotap / well	Readout
humane PBMCs	3×10^5	1,5	IFN- α , IL6 und IL-1 β (ELISA)
murine pDCs	2×10^5	1,5	IFN- α und IL6 (ELISA)

Tabelle 9: Stimulationsbedingungen verschiedener Zelllinien in einer Dotap-Stimulation.

3.3.9 NF- κ B Reporterassay

Zur Identifikation spezifischer TLR8-Liganden werden stabil mit diesem Rezeptor transfizierte HEK-Blue™ TLR8 Zellen verwendet. Die Aktivierung dieses TLRs leitet die Kerntranslokation von NF- κ B ein, dies führt über einen NF- κ B- abhängigen Promotor zur Expression einer Gaussia-Luciferase, welche im Luciferase-Assay nachgewiesen werden kann. Als Spezifitätskontrolle werden HEK-Zellen mit entsprechendem Leervektor verwendet, die analog zu den HEK-Blue™ TLR8 Zellen behandelt werden.

Der Reporterassay wird in einer 96-well-Platte in Triplikaten durchgeführt. Die HEK-Zellen werden an Tag 0 mit 3×10^4 Zellen / well in 100 µl D-MEM_{complete} ausgesät. An Tag 1 erfolgt eine Transfektion mit 2,5 ng pGL3-NF- κ B-Gaussia, 97,5 ng pCAGGS und 0,5 µl Lipofectamin2000 in 100 µl Opti-MEM pro well. Um toxische Effekte durch das Lipofectamin zu vermeiden, wird 4-6 h.p.t. das Transfektionsmedium abgenommen und durch 100 µl frisches D-MEM_{complete} ersetzt. Die Stimulation erfolgt 18 h.p.t., hierbei werden die Stimuli in 25 µl Opti-MEM / well so vorverdünnt, dass die Endkonzentration im well zwischen 0,8 und 20 ng/µl liegt. Den Proben werden 25 µl/well einer 1:5-Verdünnung von Dotap in Opti-MEM zugesetzt und damit für 5 min bei 20°C inkubiert. Anschließend werden jeweils 50 µl Stimulationsansatz zu den Zellen hinzugegeben. Die Inkubation erfolgt für 16-18 h bei 37°C und 7,5% CO₂. Anschließend werden die Überstände abgesaugt, die Zellen in 2xLysis-Juice 2 von PJK lysiert und die Reportergergenaktivität im Luciferaseassay (3.3.10) bestimmt.

Um eine stärkere TLR8-Aktivierung zu erhalten, kann den Stimulationsansätzen gleichzeitig mit den RNA-Stimuli ebenfalls Poly T mit einer Endkonzentration von 1,5 µM zugesetzt werden.

3.3.10 Luciferaseassay

Ein Luciferaseassay ermöglicht, die Aktivität eines bestimmten Promotors zu quantifizieren, da diesem ein Reportergen wie beispielsweise die Firefly- oder die Gaussia-Luciferase nachgeschaltet sind. Diese Proteine werden bei Aktivierung des Promotors exprimiert und ihre Aktivität kann im Luciferase-Assay bestimmt werden. In diesen Versuchen wurde in HEK-RIG I Zellen (vergleiche 3.3.7) ein Plasmid stabil transfiziert, das eine Firefly-Luciferase unter Kontrolle eines IFN- β Promotors enthält; außerdem wurden die unter 3.3.9 beschriebenen HEK-Blue™ TLR8 Zellen verwendet. Die Lyse der Zellen erfolgt mittels 2xLysis-Juice 2 von PJK. Je 20 μ l Zelllysate werden in eine lichtundurchlässige 96-well-Platte pipettiert. Die Messung erfolgt an einem Orion II Microplate Luminometer von Berthold Detection Systems, die Auswertung mit dem Programm Simplicity 4.1.

3.3.11 Transfektion von Proteinen mittels Saint-PhD

Durch Transfektion mittels Saint-PhD lassen sich die stimulatorischen Eigenschaften bestimmter Proteine, wie beispielsweise RNase A, direkt untersuchen. Hierbei werden Kontrollstimuli, Zellzahlen und Readout analog zu 3.3.7 eingesetzt, die Stimulationen werden ebenfalls in einer 96-well-Platte durchgeführt.

Die Proteine werden in einem möglichst geringen Volumen HEPES buffered Saline (HBS) in einem Eppendorfgefäß vorverdünnt. Eine optimale Stimulation durch RNase A erreicht man je nach Enzymaktivität bei Endkonzentrationen zwischen 0,8 und 20 ng/ μ l. Saint-PhD wird gevortext, um die Micellengröße zu verringern und dann mit 5 μ l/well zu den Ansätzen gegeben. Proteine und Saint-PhD werden für 5 min bei 20°C komplexiert, bevor die Ansätze ad 100 μ l/well mit zellspezifischem Medium aufgefüllt und zu den Zellen gegeben werden. Die Zellen werden für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bevor Überstände und Zellen in ELISA (3.4.1), qRT-PCR (3.1.9, 3.1.10) und MTT-Assay (3.3.13) analysiert werden.

3.3.12 Proteintransfektion mittels Saint-PhD

Zur Transfektion von RNase A werden HEK-Zellen am Vortag in einer 6-well-Platte ausgesät, sodass sie an Tag 1 zu 70% konfluent sind. An Tag 1 wird das Kulturmedium abgenommen, die Zellen einmalig in HBS gewaschen und dann 1 ml Opti-MEM pro well zugegeben. Der Transfektionsansatz wird in jeweils 200 μ l Liposomenpuffer mit je 80 μ l Saint-PhD angesetzt, die Endkonzentration der RNase A im well beträgt 10 bis 250 ng / μ l. Protein und Transfektionsreagenz werden für 5 min

bei 20°C inkubiert und komplexieren, bevor der Transfektionsansatz tropfenweise zu den wells hinzugegeben wird. 4 h nach Transfektion (post transfection, p.t.) werden die Zellen in Trizol lysiert, die RNA wird extrahiert (3.1.8) und in weiteren Versuchen analysiert.

3.3.13 MTT-Vitalitätsassay

Ein MTT-Assay weist die Stoffwechselaktivität lebender Zellen nach. Hierbei wird gelbes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in den Mitochondrien zu blau-violetter Formazan reduziert.

Zellen wird zu ihrem spezifischen Medium eine MTT-Endkonzentration von 500 ng/µl zugesetzt. Es folgt eine ein- bis vierstündige Inkubation bei 37°C, bis sich deutliche blaue Granula in den Zellen zeigen. Das Medium wird entfernt und die Granula in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die Intensität der Färbung und somit die Stoffwechselrate der Zellen kann im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen werden.

3.3.14 RIG I und MDA-Abschaltung mittels siRNAs

Die Transfektion von short interfering RNAs (siRNAs) ermöglicht die gezielte Abschaltung bestimmter Gene, in diesem Fall von RIG I und MDA5 und dient der Ermittlung deren Funktion.

Zur Abschaltung von RIG I werden die vier Gene Solutions Hs_DDX58_6, Hs_DDX58_8, Hs_DDX58_10 und Hs_DDX58_11, zur MDA5-Abschaltung Gene Solution Hs_IFIH1_8 und als Negativkontrolle die All Star negative control verwendet. Alle Lösungen stammen von der Firma Qiagen und haben eine Konzentration von 10 µmol/l. Aufgrund ihrer hinreichend großen RIG I und MDA5-Expression werden für dieses Experiment A549-Zellen verwendet.

An Tag 1 werden zu 100 µl Opti-MEM in einem Eppendorfgefäß je 3 µl von allen für die Abschaltung eines Gens notwendigen siRNAs pipettiert. Die Ansätze werden mit je 2 µl Lipofectamine RNAiMAX Reagent versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Ansätze in die Löcher einer 12-well-Platte vorgelegt. Dann werden $1,5 \times 10^5$ A549-Zellen/well in je 500 µl zugegeben. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 5% CO₂. An Tag 2 werden den Zellen 500 µl DMEM_{complete} zugegeben, an Tag 3 werden die Zellen expandiert. Die Stimulation (3.3.7) erfolgt an Tag 5. Um die Effektivität der Genabschaltung auf Proteinebene nachzuweisen, wird eine SDS-Gelelektrophorese (3.5.5) und anschließender Western Blot (3.5.7) mit Antikörpern gegen RIG I und MDA5 durchgeführt.

3.4 Biochemische und immunologische Methoden

3.4.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dient dem spezifischen quantitativen Nachweis gelöster Antigene. Beispielsweise kann so die Zytokinproduktion im Anschluss an ein Stimulationsexperiment (3.3.7, 3.3.11) bestimmt werden. Die Spezifität wird durch Antikörper-Wechselwirkungen gewährleistet, die Quantifizierung erfolgt über eine mitgeführte Standardreihe bekannter Konzentration und eine enzymatische Farbreaktion.

Beim Sandwich-ELISA wird ein spezifischer Fängerantikörper auf einer 96-well-Flachbodenplatte (Maxisorp) immobilisiert. Verbleibende freie Protein-Bindestellen werden daraufhin durch Inkubation mit ELISA-Blockierungspuffer abgeblockt. Die Standardreihe wird im Verhältnis 1:2 verdünnt und gemeinsam mit den zu vermessenden Zellkulturüberständen auf die Platte gegeben. Hierbei werden die Antigene durch den Fängerantikörper gebunden. Im nächsten Schritt erfolgt die Bindung des Antigens durch den Detektionsantikörper, welcher ein anderes Epitop als der Fängerantikörper bindet. Der Detektionsantikörper ist entweder direkt mit einer Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) konjugiert oder wird, häufig über eine Biotin-Markierung, von einem enzymkonjugierten Drittantikörper gebunden. Nach Zugabe des enzymkonjugierten Antikörpers erfolgt die enzymatische Farbreaktion: Hierzu werden jeweils 50 µl/well einer farblosen Lösung aus 1 mg/ml O-Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD) mit 0,03% H₂O₂ in Substratpuffer auf die Platte gegeben. Proportional zur gebundenen Antigenmenge wird H₂O₂ von der Peroxidase reduziert, was zur Oxidation des OPDs führt. Dies bildet ein lösliches gelblich-braunes Endprodukt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2-molarer Schwefelsäure abgestoppt. Die genauen Bedingungen der verwendeten ELISA sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellt.

	mIL6	mIFNα
Fänger-antikörper	rat anti mouse IL6 (1 µg/ml) in PBS _{def} 16h 4°C	rat anti mouse IFNα (1 µg/ml) in PBS _{def} 16h 4°C
Ausschlagen der Platte		
Blocken in 250 µl Blockpuffer (1% BSA in PBS _{def} 0,05% Tween)		
3x Waschen in Waschpuffer (PBS _{def} 0,05% Tween)		

Probe	unverdünnt	unverdünnt
1.Standard	10 ng/ml	500 U/ml
Standardreihe 1:2 verdünnt		
3x Waschen in Waschpuffer		
Detektions-antikörper	biotin rat-anti mouse IL6 (100 ng/ml)	rabbit polyclonal anti-mouse IFN α (0,94 μ g/ml)
3x Waschen in Waschpuffer		
Enzym - konjugat	Streptavidin-POD Konjugat (0,1 U/ml)	POD goat anti-rabbit IgG (0,16 μ g/ml)
3x Waschen in Waschpuffer		
Substratlösung: 1 mg/ml (OPD) mit 0,03% H ₂ O ₂ in Substratpuffer		

Tabelle 10: murine Zytokin-ELISA.

Die Werte geben die Endkonzentrationen der Antikörper in der 96-well-Platte an. Soweit nicht anders angegeben, werden die Komponenten in Blockpuffer verdünnt, mit einem Endvolumen von 50 μ l/well aufgetragen und für 1h bei 20°C inkubiert.

	hIL6	hIFN α	hRANTES	hIL1 β	hIL8
Fänger-antikörper	rat anti-human IL6 (0,5 μ g/ml) in PBS _{def} 16h 4°C	mouse anti human IFN α (500 ng/ml) in PBS _{def} 16h 4°C	mouse anti human RANTES (250 ng/ml) in PBS _{def} 16h 4°C	mouse anti human IL1 β (1 μ g/ml) in PBS _{def} 16h 4°C	mouse anti human IL8 (1 μ g/ml) in PBS _{def} 16h 4°C
Ausschlagen der Platte					
Blocken in 250 μ l Blockpuffer (1% BSA in PBS _{def} 0,05% Tween)					
3x Waschen in Waschpuffer					
Proben	1:5 verdünnt	unverdünnt	unverdünnt	unverdünnt	unverdünnt
1.Standard	10 ng/ml	4 μ g/ml	5 ng/ml	2 ng/ml	10 ng/ml
Standardreihe 1:2 verdünnt					
3x Waschen in Waschpuffer					
Detektions-antikörper	Biotin rat anti-human IL6 (0,5 μ g/ml)	anti-human IFN α HRP-Conjugate 1:1000	Biotin anti-human RANTES (25 ng/ml)	Biotin anti-human IL1 β (100 ng/ml)	Biotin anti-human IL8 (50 ng/ml)
3x Waschen in Waschpuffer					
Enzym - konjugat	Streptavidin-POD Konjugat (0,1 U/ml)	Detection ist Enzymkonjugat	Streptavidin-POD Konjugat (0,1 U/ml)	Streptavidin-POD Konjugat (0,1 U/ml)	Streptavidin-POD Konjugat (0,1 U/ml)
3x Waschen in Waschpuffer					
Substratlösung: 1 mg/ml (OPD) mit 0,03% H ₂ O ₂ in Substratpuffer					

Tabelle 11: humane Zytokin-ELISA.

Die Werte geben die Endkonzentrationen der Antikörper in der 96-well-Platte an. Soweit nicht anders angegeben, werden die Komponenten in Blockpuffer verdünnt, mit einem Endvolumen von 50 µl / well aufgetragen und für 1h bei 20°C inkubiert.

An einem ELISA-Plattenphotometer wird bei 490 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) die Farbentwicklung photometrisch gemessen, die Auswertung erfolgt mit dem Programm „Softmax Pro V5“. Die Antigenmengen in den unbekannten Proben werden anhand einer Standardreihe bekannter Konzentrationen errechnet.

3.4.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von Zellen bezüglich ihrer Größe, Granularität und der Expression bestimmter Proteine.

Zellen werden durch eine Kapillare einzeln angesaugt und passieren Laser und Detektoren verschiedener Wellenlänge. Zum einen wird das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) gemessen, welches die Beugung des Lichts im flachen Winkel widerspiegelt und von der Größe der Zelle abhängt. Das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) misst die Ablenkung des Lichts im 90° Winkel. Dies wird durch die Granularität der Zelle bedingt, welche beispielsweise von der Größe des Zellkerns und der Zahl der Vakuolen abhängt. Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgt über fluoreszenzmarkierte Antikörper. Verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren, ermöglichen die parallele Färbung mit bis zu drei unterschiedlichen Antikörpern. In dieser Arbeit wurden die drei Farbstoffe Fluorescein Isothiocyanate (FITC, Emission bei 520 nm), Phycoerythrin (PE, Emission bei 575 nm) und Allophycocyanin (APC, Emission bei 680 nm) verwendet. Die Einbeziehung verschiedener Größen, Granularitäten und exprimierten Oberflächenmarkern erlaubt Rückschlüsse auf verschiedene Zellpopulationen.

Eine Durchflusszytometrie-Färbung wird wie folgt durchgeführt:

$2,5 \times 10^5$ Zellen werden in ein Zytometrie-Röhrchen überführt, in 1 ml Zytometrie-Puffer (PBS_{def} mit 2 % FCS, 0,01 % Natriumacid und 2 mM EDTA) gewaschen und für 7 min bei 300 g und 4°C pelettiert. Der Überstand wird bis auf 30 µl abgesaugt. Um Fc-Rezeptoren auf den Zellen abzublocken, wird den Zellen 112 µg/ml Fc-Block in Zytometrie-Puffer zugegeben. Die Zellen werden resuspendiert und für 7 min bei 4°C mit dem Fc-Block inkubiert. Die Antikörper werden in ihrer individuell erforderlichen Konzentration (Tabelle 12) in je 30 µl Zytometrie-Puffer verdünnt und den zu färbenden Zellen zugegeben. Die Inkubation erfolgt für 30 min bei 4°C im Dunkeln. Im Anschluss werden die Zellen zweimal in 1 ml Zytometrie-Puffer gewaschen und für 7 min bei 300 g und 4°C pelettiert, der Überstand wird abgesaugt. Die Zellen werden in 150 µl

Zytometrie-Puffer resuspendiert und bis zur Durchflusszytometrie-Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die Messung erfolgt an einem „FACS Calibur“ Durchflusszytometer mit der Software „CellQuest“ (BD), zur Auswertung wird das Programm „FlowJo“ verwendet.

Antikörper	Zelltyp	Verdünnungsfaktor
B220-FITC	pDCs	1:300
CD11b-APC	Makrophagen	1:300
CD11c-FITC	mDCs, pDCs	1:300
F4/80-FITC	Makrophagen	1:300
MHCI-PE	Makrophagen	1:300
MHCII-PE	mDCs	1:300
TO-PRO (APC)	mDCs	1:30000

Tabelle 12: FACS-Antikörper

3.5 Methoden zur Proteinproduktion und Analyse

3.5.1 Heterologe RNase A - Produktion in BL21 (E.coli)

Durch heterologe Proteinexpression in BL21 lassen sich große Mengen verschiedener RNase A-Konstrukte produzieren. Die gewünschten Konstrukte werden in einen pET24a-Vektor kloniert (3.1.5) und befinden sich somit unter Kontrolle eines T7-Promotors. Vektor und Insert werden in BL21 (Stratagene) transformiert, die Selektion auf positive Klone erfolgt durch eine Kanamycin-Resistenz. Durch Zugabe von Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) wird in BL21 die Aktivität eines IPTG-induzierbaren Promotors und somit die Produktion einer nachgeschalteten T7-Polymerase angeregt. Diese T7-Polymerase translatiert dann das RNase A-Gen.

Am Vortag wird einer Übernachtskultur des gewünschten Konstruktes in LB-Medium mit Kanamycin (25 ng/ml) angeimpft. Am Folgetag wird frisches kanamycinversetztes LB-Medium mit dieser Vorkultur angeimpft. Die Kulturen werden für etwa 1 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert, bis die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) zwischen 0,5 und 0,7 liegt. IPTG wird zu einer 1 mM Endkonzentration zugegeben und die Proben für 4 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss werden die Bakterien für 20 min bei 2.680 g und 4°C pelletiert. Der Überstand wird verworfen, die Bakterien in 50 ml PBS_{def} / 200 ml LB-Medium gewaschen und erneut für 20 min bei 2.680 g und 4°C pelletiert. RNase A liegt in Einschlusskörperchen im Bakterienzytoplasma vor und kann

nach 3.5.2 weiter aufgereinigt werden. Alternativ können die Bakterienpellets bei -20°C gelagert werden.

3.5.2 Aufreinigung von RNase A aus Einschlusskörperchen

RNase A wird durch Ultraschallbehandlung und denaturierende Lösungen aus Einschlusskörperchen aufgereinigt, das nachfolgende Protokoll bezieht sich auf ein Bakterienpellet aus 200 ml LB-Medium:

40 ml Lysepuffer werden unmittelbar vor Gebrauch mit 0,24 g CHAPS PUFFERAN® und Dithiothreitol (DTT) zu einer 5 mM Endkonzentration komplettiert. Das Bakterienpellet wird nach Zugabe einer Tablette Complete Mini Protease Inhibitor in 10 ml Lysepuffer resuspendiert. Es folgt eine Ultraschallbehandlung für 15 sec und 7 Zyklen bei 70 % Intensität. Das EDTA wird durch die Zugabe von Magnesiumsulfat ad 20 mM chelatiert. Lysozym ad 100 µg/ml wird zugegeben und die Lysate für 20 min bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Zu dem Lysat werden 250 U Benzonase pipettiert, es folgt eine weitere 10-minütige Inkubation auf dem Drehrad. Die Einschlusskörperchen werden für 15 min bei 2.680 g und 4°C pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 10 ml Lysepuffer ohne Complete Mini Protease Inhibitor resuspendiert und erneut mit Ultraschall behandelt. Dieser Schritt wird zweimal wiederholt. Die Einschlusskörperchen werden erneut pelletiert, in 670 µl Rückfaltungspuffer aufgenommen und für 16 h bei 20°C auf einem Drehrad gelöst.

3.5.3 Aufreinigung von RNase A über Econo-Pac® 10DG Desalting Columns

Econo-Pac® 10DG Desalting Columns separieren Moleküle nach ihrer Größe, wobei größere Partikel schneller und kleinere Partikel langsamer durch die Säule wandern. So lässt sich RNase A von niedermolekularen Bestandteilen wie FITC und DTT, aber auch von Verunreinigungen mit bakteriellen Proteinen trennen.

Die Säule wird geöffnet, der Lagerpuffer verworfen und 10 ml PBS_{def} auf die Säule gegeben, um die Matrix zu äquilibrieren. Anschließend werden 0,5 ml Probe auf die Säule gegeben und mit 0,5 ml PBS_{def} nachgespült. Bei unbekannten Migrationseigenschaften der Proteine wird nach der Zugabe von weiteren 2 ml PBS_{def} mit dem Sammeln von 1 ml großen Fraktionen begonnen, bis die gewünschte Fraktion erreicht wird. Für die Trennung der RNase A von bakteriellen Proteinen und DTT sollte die Säule im Anschluss an das Nachspülen mit weiteren 3,5 ml PBS_{def} gewaschen werden. Die nächsten zwei Fraktionen à 1 ml enthalten reines Protein und können direkt verwendet werden. Eine dritte 1 ml Fraktion enthält zudem DTT, dieses wird durch Dialyse beseitigt.

Die absolute Proteinkonzentration kann durch einen BCA Protein Assay (3.5.4) bestimmt werden, die tatsächliche RNase A-Menge und Reinheit der Proben durch SDS-Gelelektrophorese (3.5.5) mit anschließender Comassie-Färbung (3.5.6) und über Zymogramme (3.5.8).

3.5.4 BCA Protein Assay

Im Bicinchoninsäure (Bicinchoninic Acid, BCA) Protein Assay werden Proteinkonzentrationen bestimmt und DTT-Kontaminationen nachgewiesen. Im ersten Schritt wird Cu^{2+} von Proteinen zu Cu^{1+} reduziert, im zweiten Schritt reagiert das Cu^{1+} -Ion mit Bicinchoninsäure, was zu einer intensiven Lilafärbung führt. Anhand einer Standardreihe bekannter Proteinkonzentrationen kann die Konzentration der unbekannten Probe ermittelt werden. Die Reaktion wird mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific nach Angaben des Herstellers in einer 96-well-Zellkulturplatte durchgeführt. Die Messung der Farbentwicklung erfolgt an einem ELISA-Plattenphotometer bei 490nm, die Auswertung mit dem Programm „Softmax Pro V5“.

3.5.5 Elektrophoretische Trennung von Proteinen (SDS-Gelelektrophorese)

Proteine lassen sich elektrophoretisch nach Molekulargewicht auftrennen, da sie mit Sodiumdodecylsulfat (SDS) negativ geladene Komplexe mit einem konstanten Ladungs/ Masse-Quotienten bilden. Die Auftrennung erfolgt in der Polyacrylamidmatrix eines SDS-Gels in Abhängigkeit von ihrem Stokes-Radius. Die Sekundärstrukturen der Polypeptidkette spielen hierbei keine Rolle, da sowohl SDS als auch das Disulfidbrücken-spaltende Mercaptoethanol denaturierend wirken.

Die verwendeten Gele werden nach dem Lämmli-System gegossen und bestehen somit aus Sammel- und Trenngel, die sich in pH-Wert und Acrylamidkonzentration unterscheiden. Ein Gel mit 10% Acrylamid im Trenngel setzt sich wie folgt zusammen:

	10%iges Trenngel [µl]	5%iges Sammelgel [µl]
H ₂ O	1900	1400
30% Acryl - Bisacrylamid	1700	330
1,5 M Tris (pH 8,8)	1350	-
1 M Tris (pH 6,8)	-	270
10% Ammonium persulfate (APS)	50	20
TEMED	2	2

Tabelle 13: Zusammensetzung der SDS-Gele.

Die Polymerisierung des Gels wird durch APS und TEMED initiiert.

Die zu untersuchenden Proben werden mit 6x Protein-Probenpuffer mit 20% β -Mercaptoethanol versetzt und zur vollständigen Denaturierung für 10 min auf 94°C erhitzt. Jeweils 10 μ l einer so behandelten Probe werden in eine Tasche des auspolymerisierten Gels pipettiert. Außerdem werden in eine Tasche 10 μ l des Markers gegeben.

An die Gelkammer wird eine Spannung von 80 V angelegt, bis sich die Proben im Bereich des Trenngels befinden. Dann wird die Spannung auf 120 V erhöht. Der Gellauf ist beendet, wenn die sichtbare Bande des Protein-Probenpuffers das untere Ende des Gels erreicht hat (modifiziert aus (105)).

3.5.6 Comassie-Färbung

Eine Comassie-Färbung dient der unspezifischen Färbung von Proteinen im Gel, indem es sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert.

Im Anschluss an einen SDS-Gellauf (3.5.5) wird die Gelkammer eröffnet und das Sammelgel entfernt. Das Trenngel wird in ein Gefäß mit Comassie-Färbelösung transferiert und für 30-45 min bei 20°C auf einem Schwenktisch inkubiert. Im Anschluss wird die Färbelösung entfernt und das Gel für etwa 2 h in Entfärbelösung inkubiert. Hierbei ist die Entfärbelösung mehrmals zu erneuern. Die Entfärbereaktion ist beendet, wenn das Gel weitgehend ungefärbt ist und sich deutliche blaue Proteinbanden zeigen.

3.5.7 Western Blot

Der Western Blot erfolgt im Anschluss an eine SDS-Gelelektrophorese (3.5.5). Er bezeichnet den spannungsabhängigen Transfer von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine Blotmembran; auf dieser können sie spezifisch durch Färbung mit Antikörpern nachgewiesen werden. Verwendet wird ein semidry Blotsystem von Biometra. Folgende Komponenten werden mit Transferpuffer durchtränkt und blasenfrei in der aufgeführten Reihenfolge auf der Anode der Blotkammer übereinander geschichtet: 3 Blätter Filterpapier, eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Blotmembran, das SDS-Gel und 3 Blätter Filterpapier. Nach Anschließen der Kathode wird für 35 min eine Spannung von 10 V angelegt. Das Abblocken der noch freien Proteinbindestellen auf der PVDF-Membran erfolgt bei 4°C in Westernblot-Blockierungspuffer für eine Dauer von mindestens 1 h.

Die nachfolgende Immunfärbung wird wie folgt durchgeführt: Zuerst wird die Blotmembran gewaschen, um die Blocklösung zu beseitigen. Dies erfolgt, wie jeder Waschschrift, in etwa 50 ml Western Blot Waschpuffer für 10 min in dreimaliger Wiederholung. Nach dem ersten Waschschrift wird der erste Antikörper in folgendem Verhältnis in 1 ml Antikörper-Inkubationspuffer verdünnt:

Antikörper	Verdünnungsfaktor
anti - RIG I (mouse)	1:1000
anti – MDA5 (mouse)	1:1000
anti – Aktin (rabbit)	1:2500

Tabelle 14: Liste der verwendeten Erstantikörper.

Die Inkubation der Blotmembran mit den Erstantikörpern erfolgt auf einer mit Parafilm bezogenen Glasplatte in einer „feuchten Kammer“ für 16 h bei 4°C, danach wird der zweite Waschschrift durchgeführt. Der Verdünnungsfaktor des Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers (anti-mouse bzw. anti-rabbit) in 20 ml Antikörper-Inkubationspuffer beträgt 1:10.000. Die Inkubationszeit beträgt 1 h. Es schließt sich der dritte Waschschrift an. Als Peroxidase-Substrat wird das RapidStep™ ECL Reagent von EMD Chemicals verwendet. Die Dokumentation erfolgt mit dem Bio-Rad Digitalentwickler und dem Computerprogramm „Image Lab“ (modifiziert aus (105)).

3.5.8 Reinheitskontrolle über Zymogramme

Anhand von Zymogrammen nach Probst (166) lässt sich nach SDS-Gelelektrophorese eine RNase-Aktivität lokalisieren und Molekülen bestimmter Größe zuordnen. So kann gezeigt werden, dass tatsächlich die hergestellte RNase A und nicht unspezifische Verschmutzungen für den Verdau von RNA verantwortlich ist.

Es ist auf besonders steriles Arbeiten zu achten, Reagenzien müssen RNase-frei sein, alle Schritte finden unter einer Sterilbank statt. Kämme und Glasplatten werden vor Benutzung für mindestens 20 min in H₂O₂ inkubiert und dann mit RNase-freiem Wasser abgespült. Die Zymogramme sind wie folgt zusammengesetzt:

	Trenngel [μl]	Sammelgel [μl]
u.p. H ₂ O	473	1350
Poly C (2,5 mg/ml)	1136	-
1,5 M Tris (pH 8,8)	1172	-
1 M Tris (pH 6,8)	-	790

30% Acryl - Bisacrylamid	1969	326
10% Ammonium persulfate (APS)	17	11
TEMED	3,3	2,25

Tabelle 15: Zusammensetzung der Zymogramme.

Es werden je 50 ng der zu untersuchenden RNasen pro Spur mit 6x Protein-Probenpuffer versetzt und in eine Tasche des auspolymerisierten Gels pipettiert. Außerdem werden in eine Tasche 10 µl des Markers gegeben.

An die Gelkammer wird eine Spannung von 80 V angelegt, bis sich die Proben auf Höhe des Trenngels befinden. Dann wird die Spannung auf 120 V erhöht. Der Gellauf ist beendet, wenn die sichtbare Bande des Protein-Probenpuffers das untere Ende des Gels erreicht hat.

Die Gelkammer wird eröffnet und das Gel in eine H₂O₂-desinfizierte Waschkammer überführt, die 30 ml Zymogramm-Waschpuffer mit 10 ml Isopropanol enthält. Die Waschkammer wird mit Parafilm abgedeckt und das Zymogramm für 10 min bei 20°C auf einem Schwenktisch inkubiert. Die Waschpuffer-Isopropanol-Lösung wird einmalig ausgetauscht und es schließt sich eine weitere 10-minütige Inkubationszeit an.

Die Waschpuffer-Isopropanol-Lösung wird kurzzeitig entfernt und das Zymogramm in der verschlossenen Waschkammer eingescannt, um die Position des Markers zu dokumentieren. Im Anschluss erfolgt ein Waschschrift in Zymogramm-Waschpuffer ohne Isopropanol für 10 min bei 20°C auf dem Schwenktisch mit dreimaliger Wiederholung.

Der RNase-Verdau findet in 100 ml Zymogramm-Inkubationspuffer für 16 h bei 37°C statt.

Die Färbung der RNA erfolgt für 10 min in einer 0,2 %igen Toluidine-Blue Färbelösung bei 20°C. Anschließend wird die Färbelösung verworfen und das Gel für etwa 1 h in Zymogramm-Waschpuffer entfärbt. Die Position der RNasen wird durch deutliche farblose Banden im Gel sichtbar, da sich hier keine färbbare RNA mehr befindet.

3.6 Organentnahme

3.6.1 Organpräparation

Die Präparation der Mäuse dient der Isolation des Knochenmarks. Mäuse werden durch entsprechend geschultes Personal mittels zertikaler Dislokation getötet, mit

70 % igem Ethanol desinfiziert und mit Nadeln auf einem Präparationsbrett fixiert. Femur und Tibia werden freipräpariert und auf Eis überführt. Unter einer Sterilbank wird der Knochenschaft eröffnet und das Knochenmark mit RPMI_{complete} herausgespült. Durch Auf- und Abpipettieren wird eine Einzelzellsuspension hergestellt, die für 7 min bei 300 g und 4°C pelletiert wird. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgt die Lyse der Erythrozyten durch Resuspendieren in Erythrozyten-Lysepuffer und einer siebenminütigen Inkubation bei 20°C. Die Lyse wird durch Zugabe von 5 ml RPMI_{complete} abgestoppt und die Zellen erneut für 7 min bei 300 g und 4°C pelletiert. Nach erneuter Resuspendierung kann die Zellzahl bestimmt und mit der Kultivierung erwünschter Zelltypen (3.3, 3.3.2, 3.3.3) begonnen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung eines endogenen RIG I Liganden

4.1.1 Endogene doppelsträngige RNA führt zu einer spezifischen Immunstimulation

4.1.1.1 Endogene RNA wird durch Verdau mit Einzelstrang-spezifischen RNasen immunstimulatorisch

In der Doktorarbeit von Tina von Thülen konnte gezeigt werden, dass der Verdau mit verschiedenen einzelstrangspezifischen RNasen immunstimulatorische Komponenten aus zelleigener RNA freilegt (156). Diese Ergebnisse wurden im Vorfeld dieser Arbeit reproduziert. Hierzu wurde RNA aus HEK-293 Zellen isoliert und mit DNase I behandelt (3.1.8). Im Anschluss erfolgte ein Verdau mit 0,05 U/ μ g RNase 1, 0,85 U/ μ g RNase T2 oder $2,5 \cdot 10^{-5}$ U/ μ g RNase A (3.2.2). Die gezielte RNA-Degradation wurde im Agarosegel kontrolliert (3.1.1.1) und die RNA in PBMCs zur Stimulation (3.3.5, 3.3.7) eingesetzt. Wie unter 3.3.7 beschrieben wurde die RNA in diesem Versuch und in allen nachfolgenden soweit nicht anders beschrieben mit Lipofectamin komplexiert. Die Ernte der Überstände erfolgte 18 h p.s.. Anschließend wurden diese im IFN- α -ELISA (3.4.1) eingesetzt.

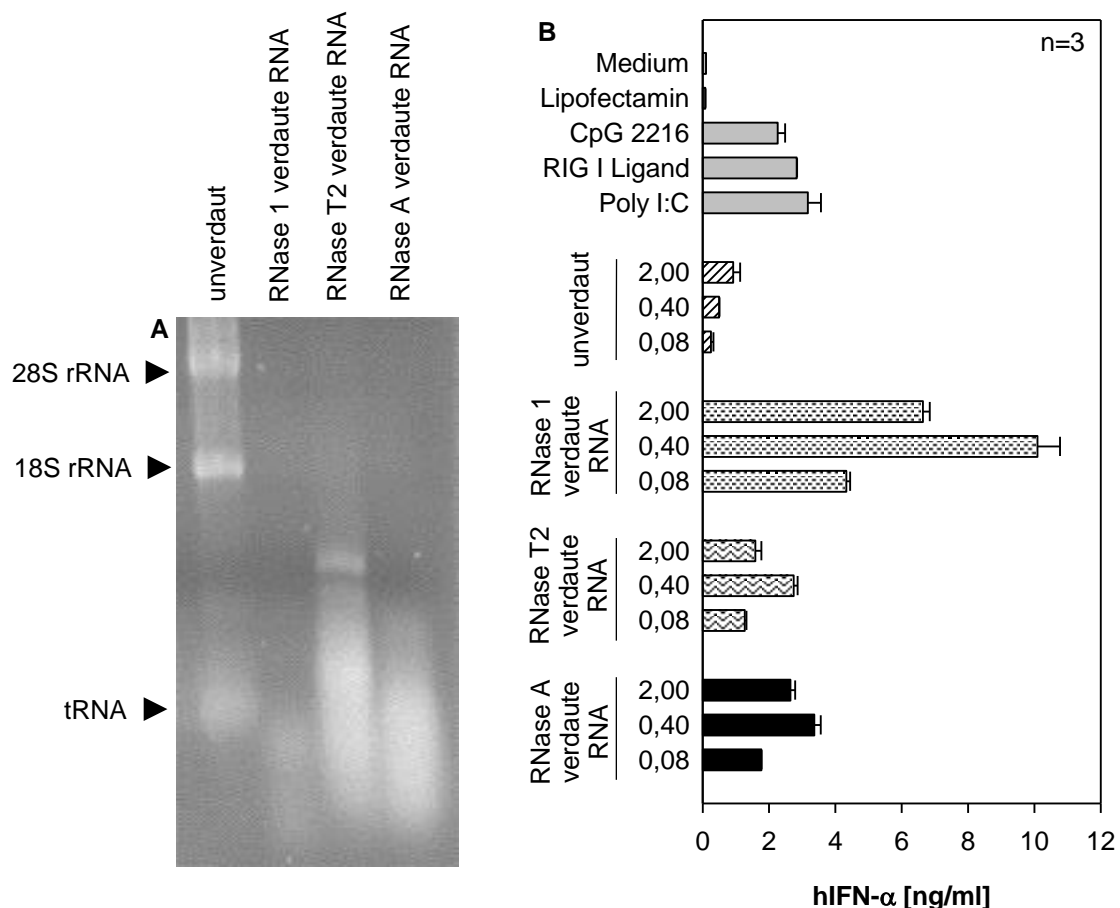


Abbildung 10: ssRNase-Verdau generiert immunstimulatorische Fragmente.

A) Auftrennung im 1,5%igen Agarosegel. Der Nachweis der Banden erfolgte mit 1%iger Ethidiumbromidlösung. **B) Freisetzung von IFN- α nach PBMC-Immunstimulation.** Humane PBMCs wurden mit entsprechenden Kontrollen und verschiedenen Mengen RNA (in $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. 18 h p.s. wurden die Überstände geerntet und mittels ELISA analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

Alle getesteten Einzelstrang-spezifischen RNasen haben eine deutliche Degradation der RNA zur Folge und führen zur Generierung immunstimulatorischer Fragmente von weniger als 200 nt Länge, die eine IFN- α Freisetzung auslösen (Abbildung 10). Unverdaute RNA ruft gelegentlich ebenfalls eine schwache Immunstimulation hervor. Dies lässt sich vermutlich auf eine schwache unspezifische Degradation der RNA während der Präparation zurückführen, die aufgrund ihrer schwachen Ausprägung im Agarosegel nicht detektierbar ist.

Im folgenden Versuch wurde die für eine Immunstimulation optimale RNase A-Konzentration austitriert. Hierzu wurde HEK-RNA mit steigenden Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-8}$ bis $5 \cdot 10^{-3}$ U RNase A/ μg RNA verdaut (3.2.2) und in Agarosegel-Elektrophorese und Immunstimulationen getestet.

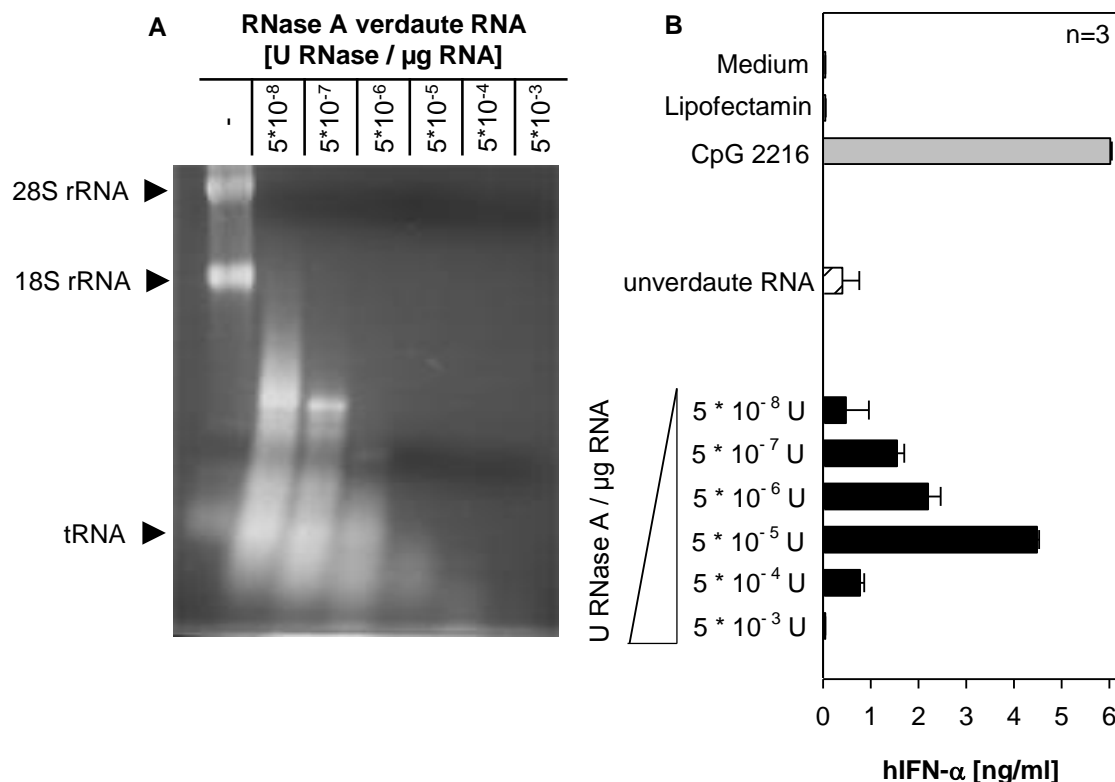


Abbildung 11: Optimierung der RNase A-Konzentration.

HEK-RNA wurde mit steigenden Konzentrationen RNase A verdaut. **A) Auftrennung im 1,5%igen Agarosegel.** Der Nachweis der Banden erfolgte mit 1%iger Ethidiumbromidlösung. **B) Freisetzung von IFN- α nach PBMC-Immunstimulation.** Humane PBMCs wurden mit zusätzlichen Kontrollen und jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$ RNA stimuliert. 18 h p.s. wurden die Überstände geerntet und mittels ELISA analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

Während die Degradation der RNA mit steigender RNase A-Konzentration ansteigt (Abbildung 11A), liegt das Optimum zur Freisetzung einer stimulatorischen Komponente bei $5 \cdot 10^{-5}$ U RNase A / μg RNA (Abbildung 11B), weshalb im Folgenden Konzentrationen in diesem Bereich gewählt wurden.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob es sich bei der Degradations-vermittelten Immunstimulation um einen RNase-spezifischen oder lediglich um einen größenabhängigen Effekt handelt. Zu diesem Zweck wurde HEK-RNA einer Metallion-vermittelten Zink- bzw. Bleihydrolyse (3.2.3 und 3.2.4) oder einer Ultraschallbehandlung (3.2.5) ausgesetzt, außerdem wurde ein RNase A-Verdau als Positivkontrolle eingesetzt. Die RNA-Degradation wurde im Agarosegel kontrolliert (3.1.1.1) und die RNA in PBMC-Immunstimulationen (3.3.5, 3.3.7) eingesetzt. Die Ernte der Überstände erfolgte 18 h p.s., anschließend wurden diese im IFN- α -ELISA (3.4.1) eingesetzt.

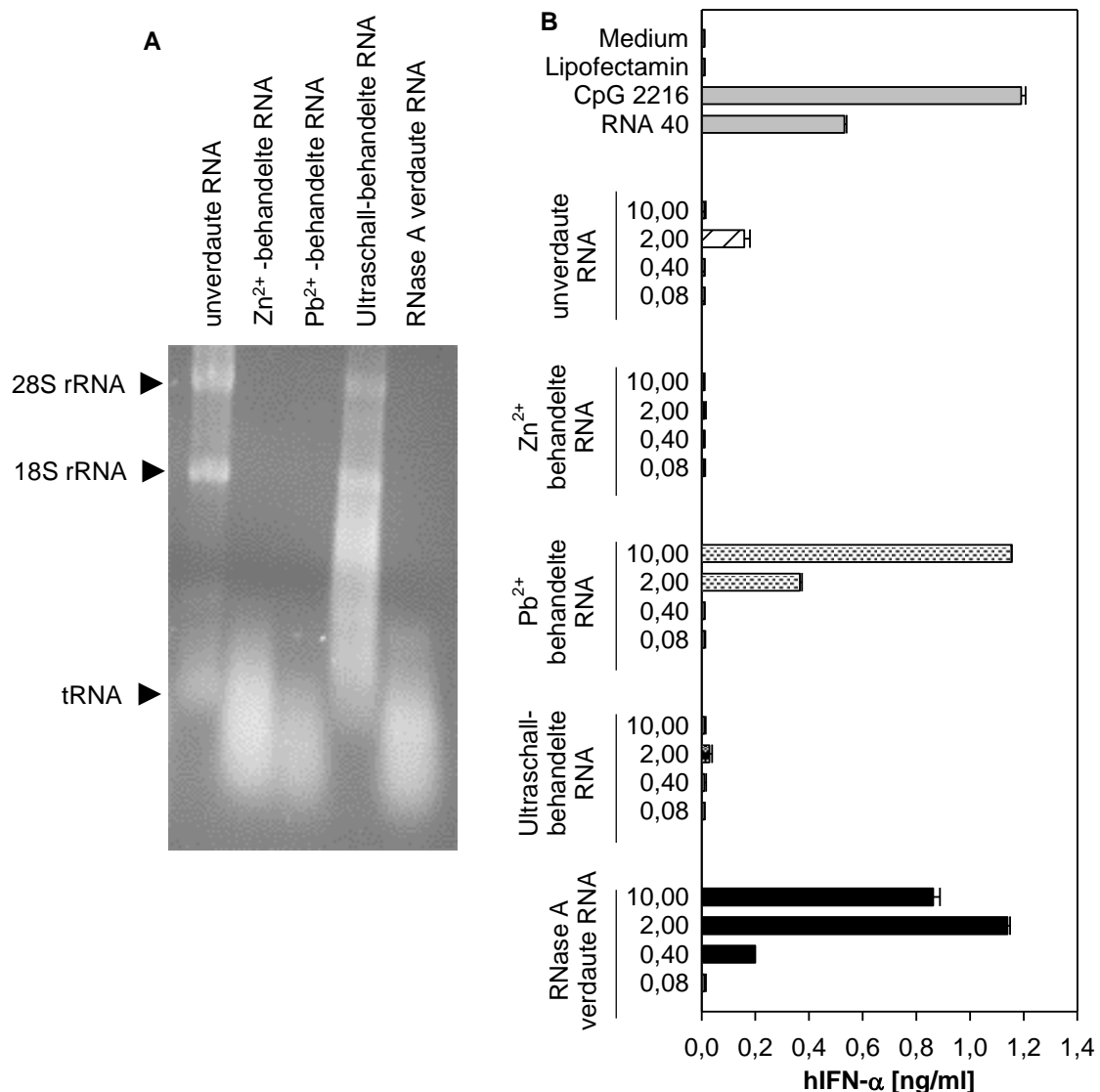


Abbildung 12: Unspezifische Fragmentierung von RNA.

HEK-RNA wurde chemisch mit Zink- und Bleihydrolyse bzw. mechanisch durch Ultraschall-Behandlung fragmentiert. Ein RNase A-Verdau wurde als Positivkontrolle eingesetzt. **A) Auftrennung im 1,5%igen Agarosegel.** Der Nachweis der Banden erfolgte mit 1%iger Ethidiumbromidlösung. **B) Freisetzung von IFN- α nach PBMC-Immunstimulation.** Humane PBMCs wurden mit Kontrollen und verschiedenen Mengen RNA (in $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. 18 h p.s. wurden die Überstände geerntet und mittels ELISA analysiert.

Durch mechanische bzw. chemische Fragmentierung der RNA wurden Fragmente ähnlicher Größe generiert wie durch den enzymatischen Verdau (Abbildung 12). Während ein RNase A-Verdau eine Immunstimulation auslöst, hat weder eine Ultraschall- noch eine Zinkbehandlung diesen Effekt. Dies deutet auf eine spezifische Freisetzung der immunstimulatorischen Komponenten durch Einzelstrang-spezifische RNasen hin. Da es im Fall der Bleihydrolyse strittig ist, ob sie ebenfalls immunstimulatorische RNA-Komponenten freisetzt oder ob Bleikontaminationen nicht vollständig durch Phenol-Chloroform-Aufreinigung (3.1.4.3) beseitigt werden können und auf diese Weise eine IFN- α Freisetzung hervorrufen, wurde sie im weiteren Verlauf dieser Arbeit außer Acht gelassen, da bereits von einem Bleiionen-vermittelten immunmodulatorischen Effekt berichtet wurde (91, 119).

4.1.1.2 dsRNase-Verdau verhindert die Immunstimulation

In folgenden Experimenten wurde ein erster Versuch unternommen, einzelne Komponenten eines immunstimulatorischen RNase-Verdaus näher zu charakterisieren. Hierzu wurden insbesondere die Doppelstrang-spezifischen Eigenschaften der RNase III ausgenutzt.

Es musste im Vorfeld verifiziert werden, dass ein RNase III-Verdau selbst nicht zur Immunstimulation führt. Dazu wurde nichtstimulatorische, DNase I-verdaute HEK-RNA mit steigenden RNase III-Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-6}$ bis $2 \cdot 10^{-1}$ U RNase III/ μg RNA verdaut (3.2.2) und in einer Immunstimulation eingesetzt.

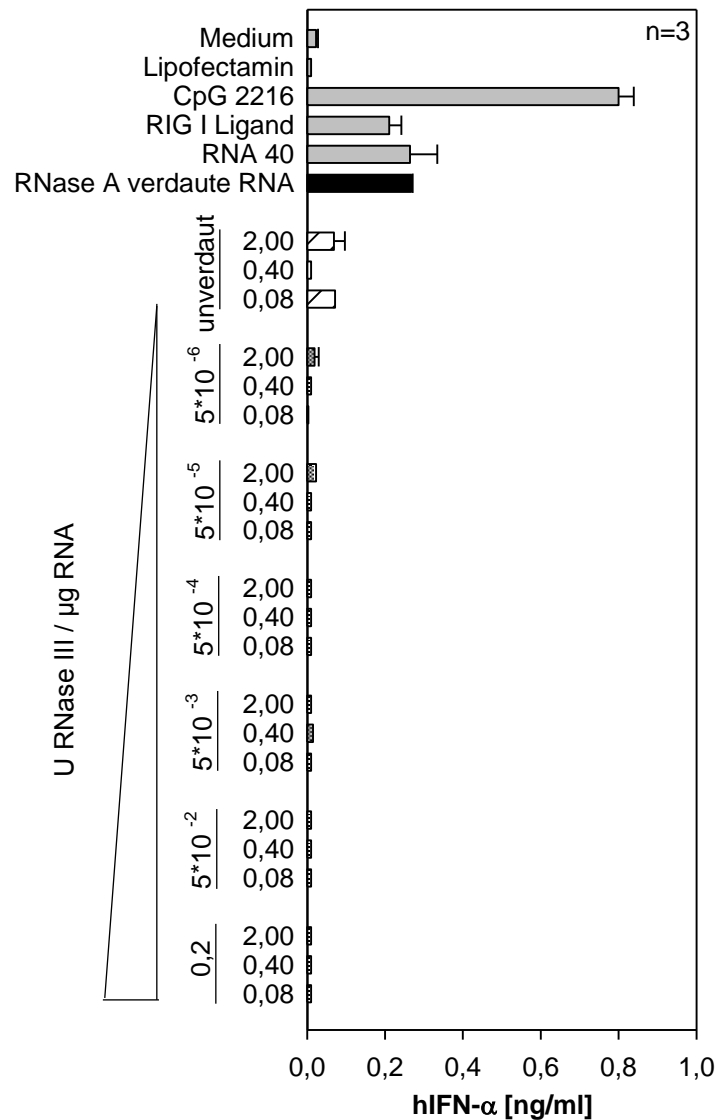


Abbildung 13: Verdau mit ds-spezifischer RNase III führt nicht zur Immunstimulation.

HEK-RNA wurde mit steigenden Konzentrationen RNase III verdaut. Humane PBMCs wurden mit Kontrollen und verschiedenen Mengen RNase III verdauter RNA (in µg/ml) stimuliert. 18 h p.s. wurden die Überstände geerntet und mittels ELISA analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

Obwohl die Zellen deutlich auf eine Stimulation mit RNase A-verdauter RNA und verschiedenen Kontrollen für RLRs und TLRs reagieren, lässt sich als Antwort auf eine Stimulation mit unverdauter oder RNase III verdauter RNA keine IFN-α-Produktion nachweisen (Abbildung 13). Somit kann eine RNase III-vermittelte Immunstimulation ausgeschlossen werden.

Da RNase A Einzelstränge verdaut, bestehen Produkte eines solchen Verdaus überwiegend aus RNA-Doppelsträngen. Diese werden wiederum von doppelstrang-spezifischer RNase III verdaut. Ein RNase A-Verdau sollte durch nachfolgende Behandlung mit RNase III seine stimulatorischen Eigenschaften wieder verlieren. Ein solcher Verdau mit $2,5 \cdot 10^{-5}$ U RNase A/µg RNA und 0,025 U RNase III/µg RNA (3.2.2)

wurde für die Stimulation humaner Monozyten eingesetzt, die Überstände wurden 18h p.s. geerntet und ihr IFN- α -Gehalt im ELISA gemessen.

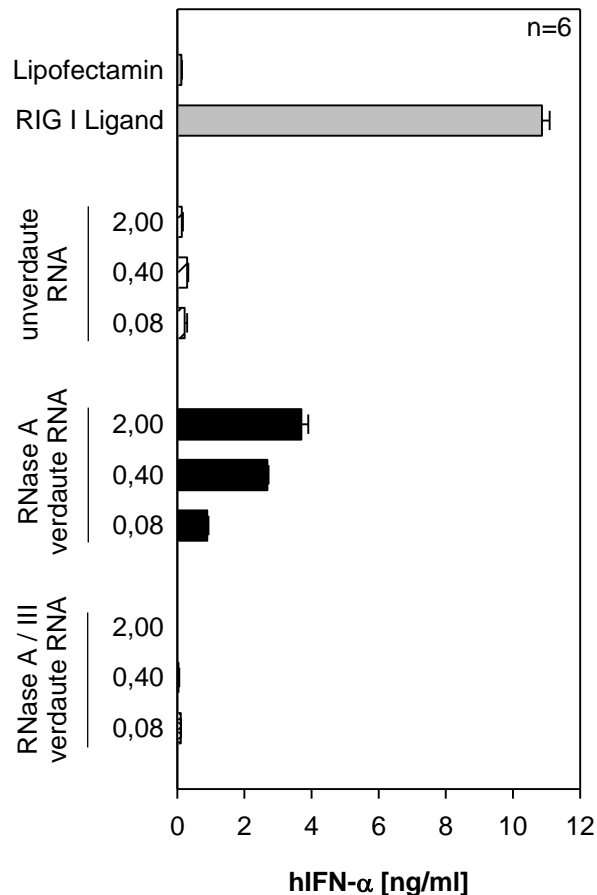


Abbildung 14: Verhinderung einer immunstimulatorischen Aktivität durch RNase A/III Doppelverdau.

DNase-verdaute HEK-RNA wurde mit $2,5 \cdot 10^{-5}$ U/ μ g RNase A und anschließend teilweise mit 0,025 U/ μ g RNase III verdaut. RNase-Verdaue (in μ g/ml) und Kontrollen wurden zur Stimulation von humanen Monozyten eingesetzt. 18 h p.s. wurden die Überstände geerntet und mittels ELISA analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus sechs unabhängigen Versuchen.

Während unverdaute HEK-RNA eine geringfügige Hintergrundstimulation und RNase A-verdaute RNA eine deutliche IFN- α -Produktion auslöste, wurde eine IFN- α -Produktion durch nachfolgenden RNase III-Verdau vollkommen verhindert. Somit führt RNase III zu einer Beseitigung der stimulatorischen Eigenschaften.

4.1.1.3 RNase-Verdau generiert ein charakteristisches, methylierungsbedingtes Bandenmuster

Weiterhin wurde versucht, potentiell stimulatorische RNA-Fragmente bezüglich ihrer Größe, Sequenz oder Modifikation zu charakterisieren. Dabei wurde insbesondere der soeben beschriebene Effekt der RNase III-verhinderten Immunstimulation ausgenutzt. HEK-RNA wurde mit $2,5 \cdot 10^{-5}$ U RNase A/ μ g RNA und zum Teil mit 0,025 U

RNase III/ μg RNA verdaut (3.2.2), anschließend erfolgte eine Auftrennung im 15%igen Polyacrylamid-Gel.

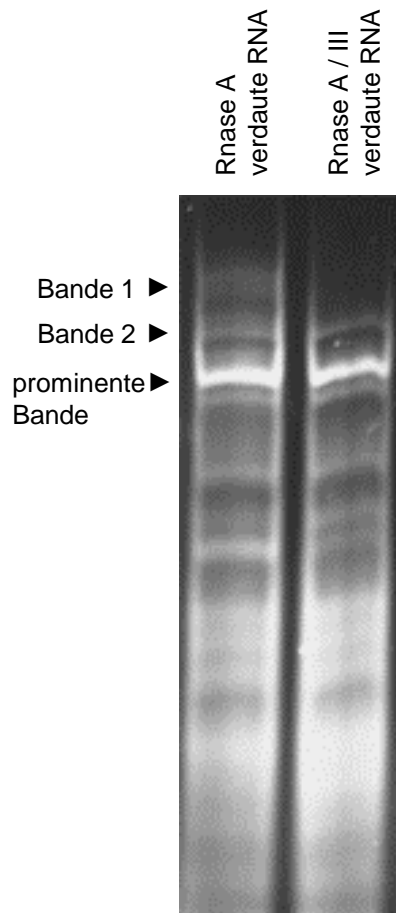


Abbildung 15: PAA-Gelelektrophorese RNase-verdauter RNA.

HEK-RNA wurde mit $2,5 \cdot 10^{-5}$ U/ μg RNase A und anschließend teilweise mit 0,025 U/ μg RNase III verdaut. Jeweils 500 ng RNA wurden in einem 15%igen PAA-Gel elektrophoretisch getrennt und anschließend mit 0,01%iger SYBR-Gold-Lösung gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus sechs unabhängigen Versuchen.

Der Verdau von Gesamt-RNA führt zur Ausbildung eines charakteristischen, hoch reproduzierbaren Bandenmusters (vergleiche Abbildung 15). Zuerst fällt eine prominente Bande auf, die bei RNase A-Verdau entsteht und auch im RNase III-Verdau stabil bleibt. Im höhermolekularen Bereich über der prominenten Bande befindet sich im RNase A-Verdau eine Doppelbande, welche im weiteren Verlauf als „Bande 2“ bezeichnet wird und nach RNase III-Verdau nur noch als Einzelbande vorliegt. Die RNase A-verdaute RNA weist eine weitere, höhermolekulare Bande auf; diese erhielt die Bezeichnung „Bande 1“ und ist nach RNase III-Verdau nicht mehr detektierbar. Auch im niedermolekularen Bereich sorgt ein RNase A-Verdau für die Ausbildung eines charakteristischen Bandenmusters, welches durch RNase III-Behandlung nicht sichtbar beeinflusst wird. Unter Berücksichtigung all dieser Fakten wurde postuliert, dass in Bande 1 und dem größten Anteil der Bande 2 die gesuchten immunstimulatorischen Komponenten enthalten sind.

Der Bereich der potentiell stimulatorischen Banden aus einem RNase A-Verdau wurde aus einem Polyacrylamid-Gel extrahiert (3.1.4.2), mittels Adapterligation kloniert (3.2.11) und sequenziert (vergleiche auch 4.1.3). Alle Sequenzen über 30 nt Länge aus 55 Klonen sind in Tabelle 16 dargestellt:

Zusammenfassung der klonierten Sequenzen:

Sequenzen aus der 18S rRNA (NCBI Reference Sequence: NR_003286.2):

Start	Ende	Länge (nt)	Sequenz	Häufigkeit
1718	1765	48	GATTGGATGGTTTAGTGAGGCCCTCGGATCGGCC CCGCCGGGGTCGGC	2
1721	1765	45	TGGATGGTTTAGTGAGGCCCTCGGATCGGCCCCG CCGGGGTCGGC	1
1722	1753	32	GGATGGTTTAGTGAGGCCCTCGGATCGGCCCC	1
	1760	39	CCCCGGCGGGGCCGATCCGAGGGCCTCACTAAA CCATCC	1
	1756	35	GGATGGTTTAGTGAGGCCCTCGGATCGGCCCCG CC	1
	1764	43	GGATGGTTTAGTGAGGCCCTCGGATCGGCCCCG CCGGGGTCGG	2
	1765	44	GGATGGTTTAGTGAGGCCCTCGGATCGGCCCCG CCGGGGTCGGC	19
1724	1765	42	ATGGTTTAGTGAGGCCCTCGGATCGGCCCCGCC GGGGTCGGC	1
1726	1765	40	GGTTTAGTGAGGCCCTCGGATCGGCCCCGCCGG GGTCGGC	3
1728	1765	38	TTTAGTGAGGCCCTCGGATCGGCCCCGCCGGGG TCGGC	1
1729	1765	37	TTAGTGAGGCCCTCGGATCGGCCCCGCCGGGGT CGGC	2
1731	1765	35	AGTGAGGCCCTCGGATCGGCCCCGCCGGGGTCTG GC	1
1733	1765	33	TGAGGCCCTCGGATCGGCCCCGCCGGGGTCTGGC	1
1734	1765	32	GAGGCCCTCGGATCGGCCCCGCCGGGGTCTGGC	1

Sequenzen aus der 28S rRNA (NCBI Reference Sequence: NR_003287.2):

Start	Ende	Länge (nt)	Sequenz	Häufigkeit
3226	3282	57	CGGCGGCGGGCGGCGACTCTGGACGCGAGCCGG GCCCTTCCCGTGGATCGCCCCAGCT	1

Sequenzen aus der 45S rRNA / 5' ETS (NCBI Reference Sequence: NR_046235.1):

Start	Ende	Länge (nt)	Sequenz	Häufigkeit
936	967	32	GAGGGAGCTCGTCTGTGTGGGGTTCGAGGCGG	1

Tabelle 16: Sequenzierung des RNase A-Verdaus nach Tuschl.

Potentiell stimulatorische RNA-Fragmente wurden durch Gelextraktion aufgereinigt, mit Hilfe der Adapterligations-Klonierung nach Tuschl vervielfältigt, kloniert und sequenziert. Die Sequenzen wurden mittels BLAST ausgewertet und befinden sich in der humanen ribosomalen RNA. Start und Ende beziehen sich auf ihre Position in der rRNA, die Häufigkeiten auf ihr Vorkommen in insgesamt 55 ausgewerteten Sequenzierungen.

Neben den in Tabelle 16 dargestellten Sequenzen wurden weiterhin kürzere Bruchstücke detektiert, die der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt wurden. Sämtliche längeren Fragmente entstammen der ribosomalen RNA, wobei 37 von 39 dargestellten Sequenzen zur Helix 44 der 18S rRNA gehören (10). Diese überlappen stark und stammen aus dem Bereich zwischen Nukleotid 1718 bis Nukleotid 1765. Besonders ein 44mer von Nukleotid 1722 bis 1765 trat mit 19 Sequenzen gehäuft auf, weshalb ihm im weiteren Verlauf besondere Aufmerksamkeit galt.

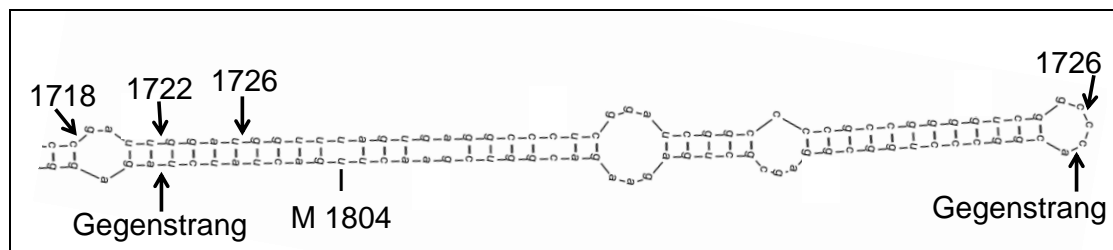


Abbildung 16: Schnittstellen in der Helix 44.

Die Faltung der Helix 44 wurde mit dem Programm mfold durchgeführt. Die RNase A-generierten Schnittstellen der detektierten Fragmente sind mit Pfeilen und den entsprechenden Nukleotidstart- und Endpositionen der resultierenden Fragmente gekennzeichnet. Die Schnittstellen des korrespondierenden Gegenstranges sind ebenfalls mit Pfeilen eingezeichnet. M1804 markiert die 2'O-Ribosemethylierung des Uridins 1804.

Das detektierte 44mer liegt in der Helix 44 als Doppelstrang mit einer komplementären Sequenz vor (Abbildung 16). Somit stellt sich die Frage, warum er nicht ebenfalls sequenziert wurde. Um dies zu überprüfen, wurde die Helix 44 an entsprechenden RNase A-Schnittstellen hypothetisch geschnitten, sodass sich ein Gegenstrang zum 44mer ergibt. Es wurden entsprechende spezifische Primer generiert und die Fragmente in einer stem-loop PCR (3.2.10) quantifiziert. Mangels Möglichkeit zur Eichung auf ein House Keeping Gen wurden gleiche Mengen unverdaute HEK-RNA, RNase A-verdaute HEK-RNA und RNase A/III-verdaute HEK-RNA eingesetzt.

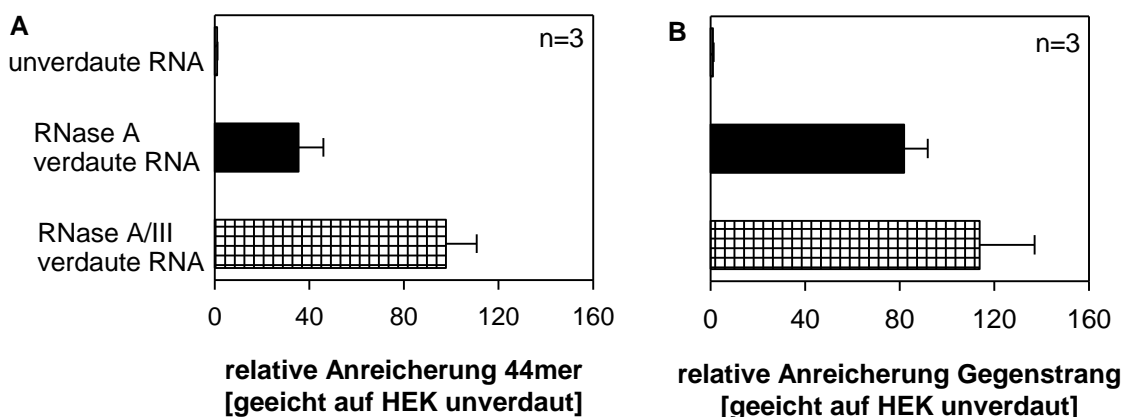


Abbildung 17: Quantifizierung von 44mer und Gegenstrang mittels stem-loop qRT-PCR.

Die RNA-Fragmente wurden mit 3'-spezifischen stem-loop Primern in cDNA umgeschrieben und in einer Mini Opticon qPCR-Maschine von Bio-Rad analysiert. Angezeigt sind die relativen Häufigkeiten der RNA-Fragmente, geeicht auf ihr jeweiliges Vorkommen in unverdauter HEK-RNA. **A) Relative Häufigkeiten des 44mers. B) Relative Häufigkeiten des korrespondierenden Gegenstranges.** Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

Das 44mer konnte nicht in unverdauter HEK-RNA detektiert werden, somit ist die qRT-PCR spezifisch (vergleiche Abbildung 17A). Bei RNase A-Verdau entsteht das 44mer und wird durch einen RNase III-Verdau weiter angereichert, was gegen eine stimulatorische Aktivität des 44mers spricht. Diese weitere Anreicherung kommt vermutlich dadurch zu Stande, dass die RNase III weitere Fragmente, unter anderem auch die stimulatorischen, verdaut, was zu einer prozentualen Anreicherung der unverdauten Komponenten führt. Gleiches gilt für den Gegenstrang (vergleiche Abbildung 17B), welcher ebenfalls nach RNase-Verdau in einer stem-loop PCR detektiert wird, obwohl er nicht sequenziert wurde. Dies liefert einen ersten Hinweis auf eine Selektion bestimmter RNA-Fragmente in der Adapterligation nach Tuschl, der PCR, der Klonierung oder der Sequenzierung.

Als nächstes galt es herauszufinden, um welche Bande im PAA-Gel es sich bei dem detektierten 44mer und dem korrespondierenden Gegenstrang handelt. Hierzu wurden die beiden Oligos einer Annealingreaktion unterzogen (3.2.9) und in Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.1.1.1) und Immunstimulationen (3.3.5, 3.3.7) eingesetzt. Um die Rezeptorabhängigkeit des 44mers als Einzelstrang zu ermitteln, wurden neben humanen PBMCs auch aus dem Knochenmark von wt und TLR379 ko Mäusen differenzierte pDCs (3.3.3, 3.3.7, 3.6) stimuliert. Die Auswertung erfolgte mit einer SYBR-Gold Färbung bzw. einem ELISA gegen das murine oder humane IFN- α (3.4.1).

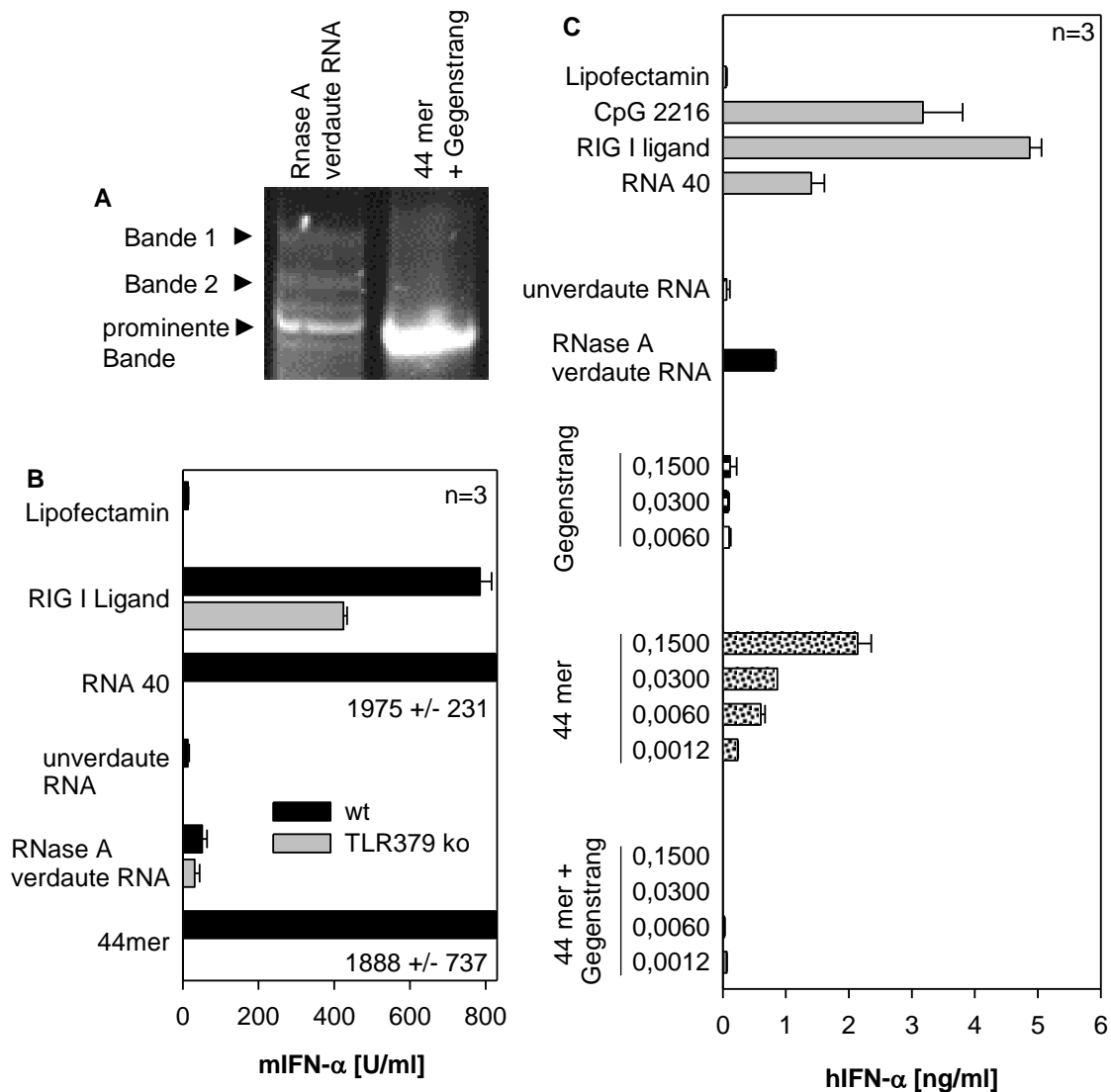


Abbildung 18: Identifikation des 44mers als nichtstimulatorische prominente Bande. RNA-Oligonukleotide wurden in komplementären Strängen zusammengelagert. **A) Auftrennung im 15%igen PAA-Gel.** Die Färbung erfolgte mit 0,01%iger SYBR-Gold-Lösung. **B) Freisetzung von IFN-α nach pDC-Immunstimulation.** Murine pDCs wurden mit den angegebenen Kontrollen und jeweils 2 µg/ml unverdauter RNA bzw. 44mer stimuliert. Die Überstände wurden 18 h p.s. geerntet und die Zytokinproduktion im ELISA vermessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen. **C) Freisetzung von IFN-α nach Monozyten-Immunstimulation.** Humane Monozyten wurden mit Kontrollen, 0,4 µg/ml verdaute bzw. unverdaute RNA und verschiedenen Molaritäten RNA-Oligonukleotiden (nmol/ml) stimuliert. 18 h p.s. wurden die Überstände geerntet und mittels ELISA analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

Wie die Größenanalyse in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt, befinden sich 44mer und Gegenstrang auf der Höhe der nichtstimulatorischen prominenten Bande (vergleiche Abbildung 18A). Das 44mer alleine stimuliert über den TLR7-Rezeptor (vergleiche Abbildung 18B). Der Gegenstrang alleine und der Doppelstrang aus 44mer und Gegenstrang führen zu keiner Immunstimulation (vergleiche Abbildung 18C). Die TLR7-Aktivierung durch das 44mer wird vermutlich durch die Methylierung des Gegenstranges gehemmt. Da es auch in RLR-kompetenten Zellen nicht zu einer Stimulation kommt, handelt es sich bei dem 44mer-Gegenstrang-Duplex auch nicht um einen RLR-Liganden. Somit sind die gefundenen Komponenten aus der Helix 44 der

18s rRNA kein Anteil der stimulatorischen Fraktion und/oder der Bande 1 und 2 (vergleiche 4.1.2).

4.1.1.4 RNA proliferierender Zellen besitzt nach RNase A Verdau ein erhöhtes stimulatorisches Potential

Es galt nachzuweisen, dass es sich bei dem immunstimulatorischen Potential von RNase A-verdauter RNA nicht um eine zelllinien- oder speziesspezifischen Eigenschaft handelt, sondern um einen verbreiteten Effekt. Hierzu wurde RNA aus primären Zellen und Zelllinien verschiedener Spezies mit $2,5 \cdot 10^{-5}$ U RNase A/ μ g RNA verdaut. Es erfolgte eine Auftrennung in einer PAA-Gelelektrophorese (3.1.1.1) mit anschließender SYBR-Gold Färbung. Sowohl verdaute als auch unverdaute RNA wurde mit Kontrollen in einer PBMC-Immunstimulationen (3.3.5, 3.3.7) eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mittels IFN- α ELISA (3.4.1).

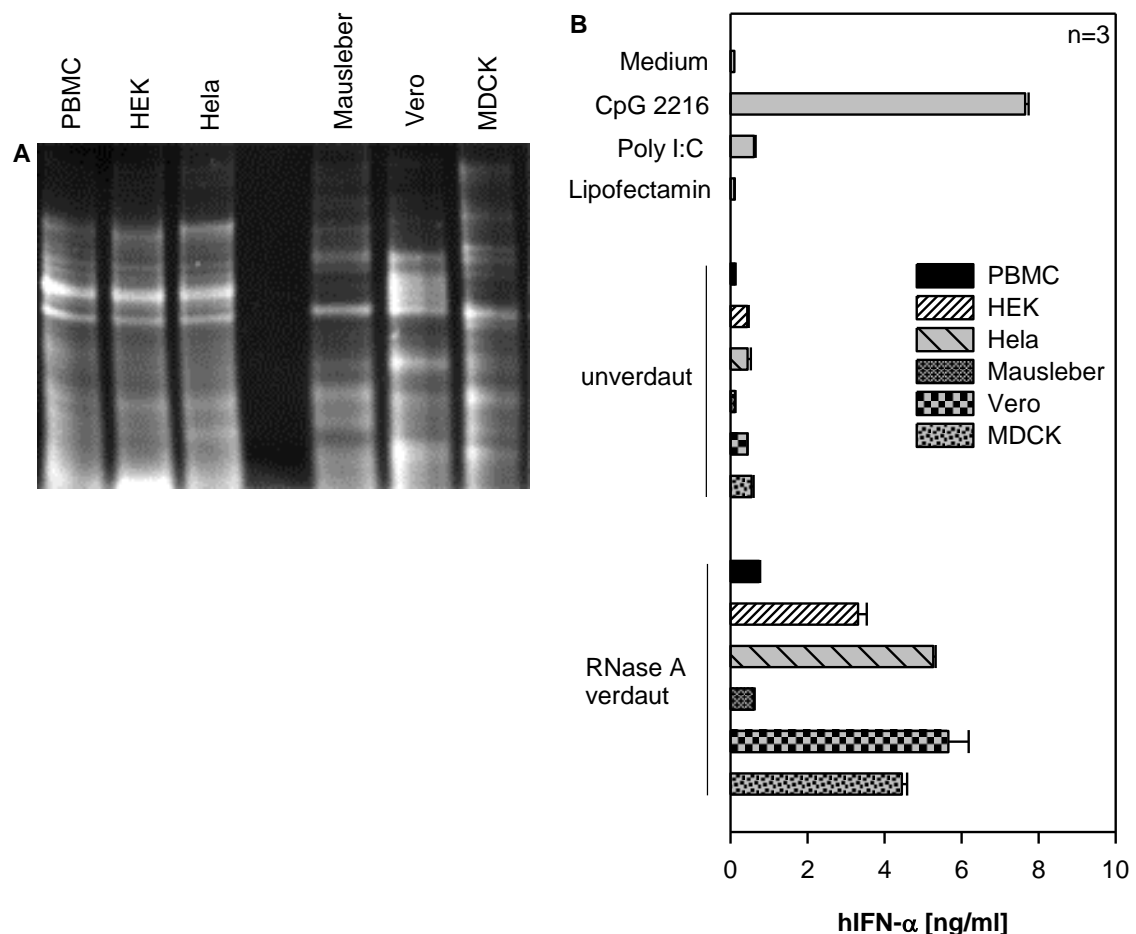


Abbildung 19: RNase A Verdau führt zu einem speziesspezifischen Bandenmuster mit variabler stimulatorischer Aktivität.

RNA aus primären Zellen und Zelllinien verschiedener Spezies wurde mit $2,5 \cdot 10^{-5}$ U/ μ g RNase A verdaut. **A) Auftrennung im 15%igen PAA-Gel.** Die Färbung erfolgte in 0,01%iger SYBR-Gold-Lösung. **B) Freisetzung von IFN- α nach Immunstimulation.** Humane PBMCs wurden mit Kontrollen und 0,4 μ g/ml RNA stimuliert. 18 h p.s. wurden die Überstände geerntet und mittels ELISA analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

Wie

Abbildung 19A zeigt, ist das RNase A-generierte Bandenmuster in humanen Zellen konserviert (PBMC, HEK, Hela). Der Verdau von RNA tierischen Ursprungs (Mausleber, Vero [Grüne Meerkatze], MDCK [Cocker Spaniel]) generiert ein ähnliches aber verschiedenes Bandenmuster. Offenbar besteht dieses aus RNA-Sequenzen, die in der Zelle häufig und konserviert auftreten, was die Vermutung aufwirft, dass es sich um ribosomale RNA handelt. Weiterhin hängt die Generierung einer immunstimulatorischen Komponente nicht von der Spezies, sondern vom Proliferationsstatus der RNA-produzierenden Zelle ab (

Abbildung 19B). Wie bereits gezeigt, löst ein RNase A-Verdau aus den Zelllinien HEK, Hela, Vero und MDCK eine hohe IFN- α Produktion aus. Hingegen ruft RNA aus den primären, nicht proliferierenden PBMCs und Mausleberzellen nach Verdau mit RNase A zwar eine stärkere Immunstimulation hervor als im unverdauten Zustand, allerdings ist diese deutlich schwächer als die Immunstimulation durch die verdaute RNA der Zelllinien.

Um einen sonstigen Zelllinien-spezifischen Effekt auf die Rezeptoraktivierung auszuschließen, wurde die stimulatorische Aktivität und der Gehalt verschiedener rRNA-Spezies von proliferierenden PBMCs (3.3.4) mit der von nicht-proliferierenden verglichen.

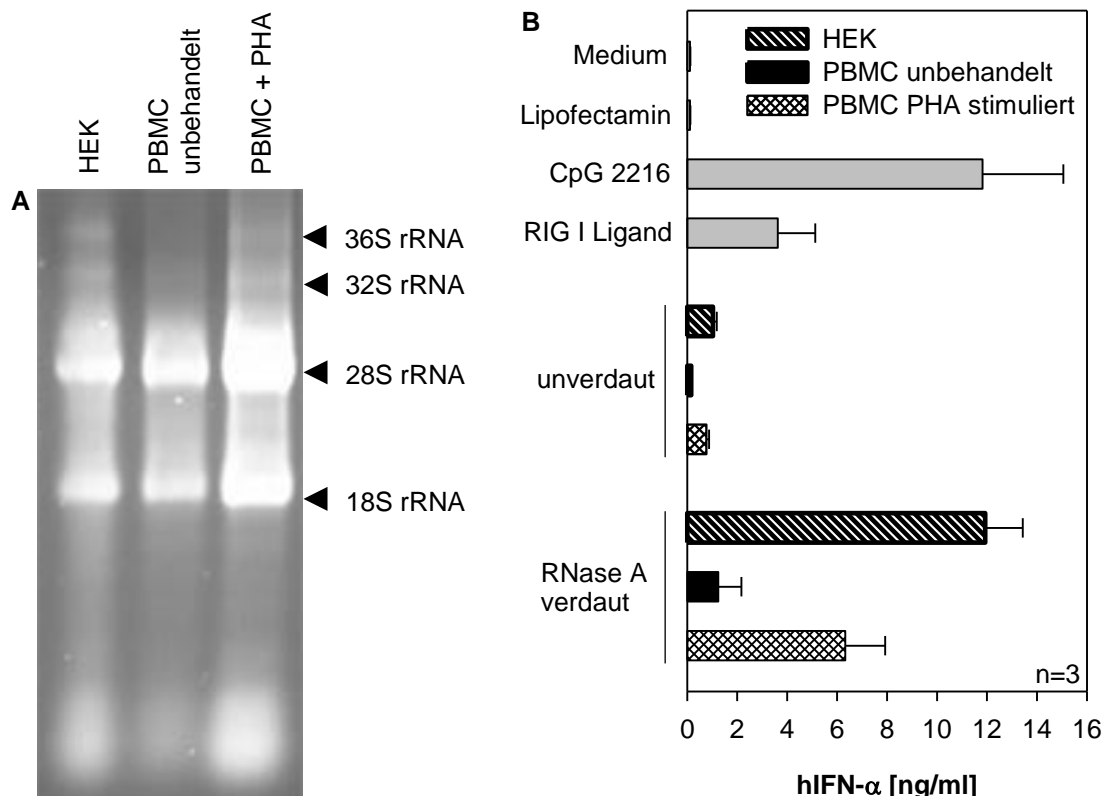


Abbildung 20: Stimulatorische Eigenschaften zellulärer RNA werden durch die Gegenwart von 45S rRNA-Prozessierungsintermediaten beeinflusst.

Die Proliferation humaner PBMCs wurde mittels PHA induziert. Die RNA proliferierter und unproliferierter PBMCs wurde extrahiert und mit $2,5 \cdot 10^{-5}$ U/ μ g RNase A verdaut. **A) Auftrennung im 1,5%igen Agarosegel.** Die Färbung erfolgte in 1%iger Ethidiumbromidlösung. **B) Freisetzung von IFN- α nach Immunstimulation.** Humane PBMCs wurden mit Kontrollen und jeweils 2 μ g/ml RNA stimuliert. 18 h p.s. wurden die Überstände geerntet und mittels ELISA analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

Im Agarosegel (Abbildung 20A) zeigen sich bei der RNA aus proliferierenden Zellen (HEK, PBMC+PHA) neben dem typischen Bandenmuster aus 28S und 18S rRNA deutlich längere RNA-Banden. Hierbei handelt es sich um die 45S-Prozessierungsintermediate 36S und 32S rRNA. Aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit werden diese Intermediate in der RNA nichtproliferierender PBMCs nicht detektiert. Analog dazu hat die RNA aus proliferierenden Zellen eine viel höhere stimulatorische Fähigkeit als die RNA aus nicht-proliferierenden Zellen (Abbildung 20B). Dies deutet darauf hin, dass der gesuchte Ligand aus einer Sequenz generiert wird, die in der 36S bzw. 32S rRNA noch vorhanden ist und bei weiteren Prozessierungsschritten verloren geht. Dem zufolge muss die immunstimulatorische Sequenz in der ITS1, ITS2 oder 3'ETS-Region enthalten sein (zum Vergleich: 1.6).

4.1.2 Produkte eines RNase A-Verdau fungieren als endogener RIG I Ligand

Die folgende Versuchsreihe diente der Ermittlung des Rezeptors, über den der durch RNase A Verdau generierte Ligand eine Immunaktivierung induziert.

4.1.2.1 Produkte eines RNase A-Verdau stimulieren ausschließlich über RLRs

Es galt zu untersuchen, ob das gesuchte Fragment RLRs, TLRs oder beide Rezeptortypen stimuliert. Hierzu wurden Makrophagen aus dem Knochenmark verschiedener Mausstämmen generiert (3.6, 3.3): Wildtyp (wt)-Mäuse verfügen sowohl über RLRs als auch TLRs, in IPS knockout (ko)-Mäusen ist die Signalweiterleitung der RLRs verhindert, TLR379 ko-Mäuse verfügen nicht mehr über Nukleinsäure-erkennende TLRs. Die mCSF-differenzierten Knochenmarkszellen wurden sowohl mit Kontrollen als auch mit unverdauter und RNase A-verdauter RNA stimuliert (3.3.7). Die Überstände wurden 18h p.s. geerntet und im ELISA (3.4.1) ausgewertet.

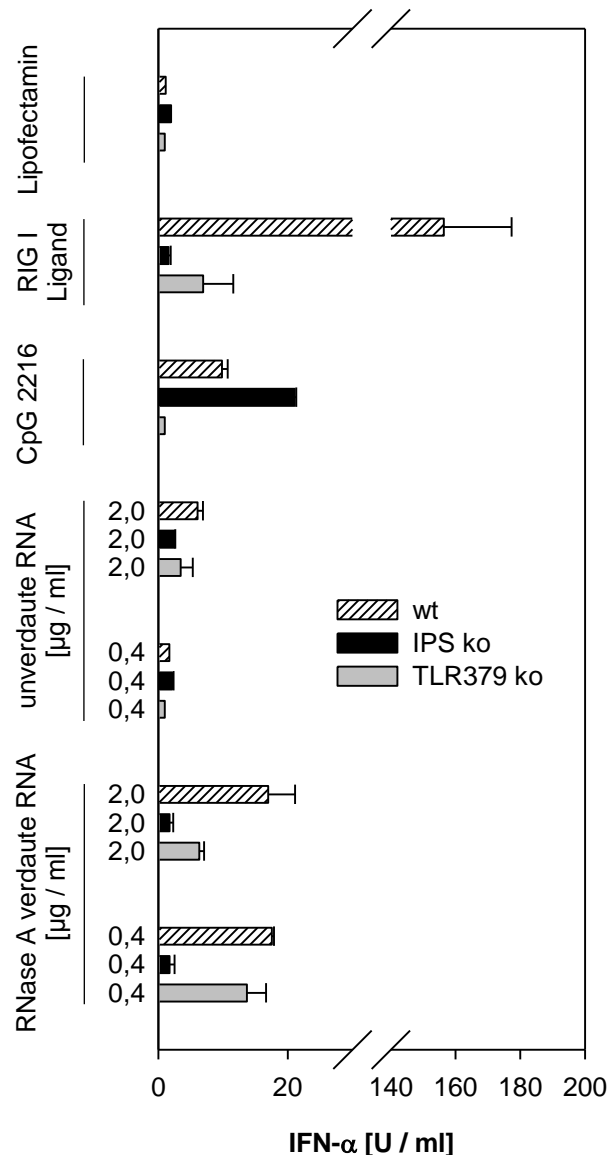


Abbildung 21: Produkte eines RNase A-Verdaus stimulieren über RLRs, nicht über TLRs. Murine Makrophagen wurden an Tag 5 mit Kontrollen und 0,4 bzw. 2 $\mu\text{g/ml}$ RNA stimuliert. Die Überstände wurden 18h p.s. geerntet und anschließend im ELISA analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

Während wt-Zellen und TLR379 ko-Zellen auf RNase A verdaute RNA mit der Freisetzung von mIFN- α antworten, gibt es diesen Effekt in IPS-ko Zellen nicht. Folglich wird durch den Verdau zellulärer RNA mit ss-spezifischen RNasen ein RLR-Ligand aber kein TLR-Ligand freigesetzt.

4.1.2.2 Produkte eines RNase A-Verdau aktivieren RIG I, nicht aber MDA5

Welcher RLR durch den RNase-Verdau stimuliert wurde, wurde anschließend analysiert. Zum einen wurden hierzu A549-Zellen eingesetzt, die sowohl RIG I als auch MDA5 exprimieren und auf eine Stimulation dieser Rezeptoren mit der Produktion von Zytokinen wie z.B. RANTES reagieren. Ein spezifisches siRNA vermitteltes Abschalten von RIG I und / oder MDA5 (3.3.14) verhindert eine Ligandenerkennung durch den

jeweiligen Rezeptor und nachfolgend die Zytokinproduktion. Dies wurde in Immunstimulationen, in denen neben dem RLR-Liganden auch Kontroll-siRNAs eingesetzt wurden, ausgenutzt (3.3.7).

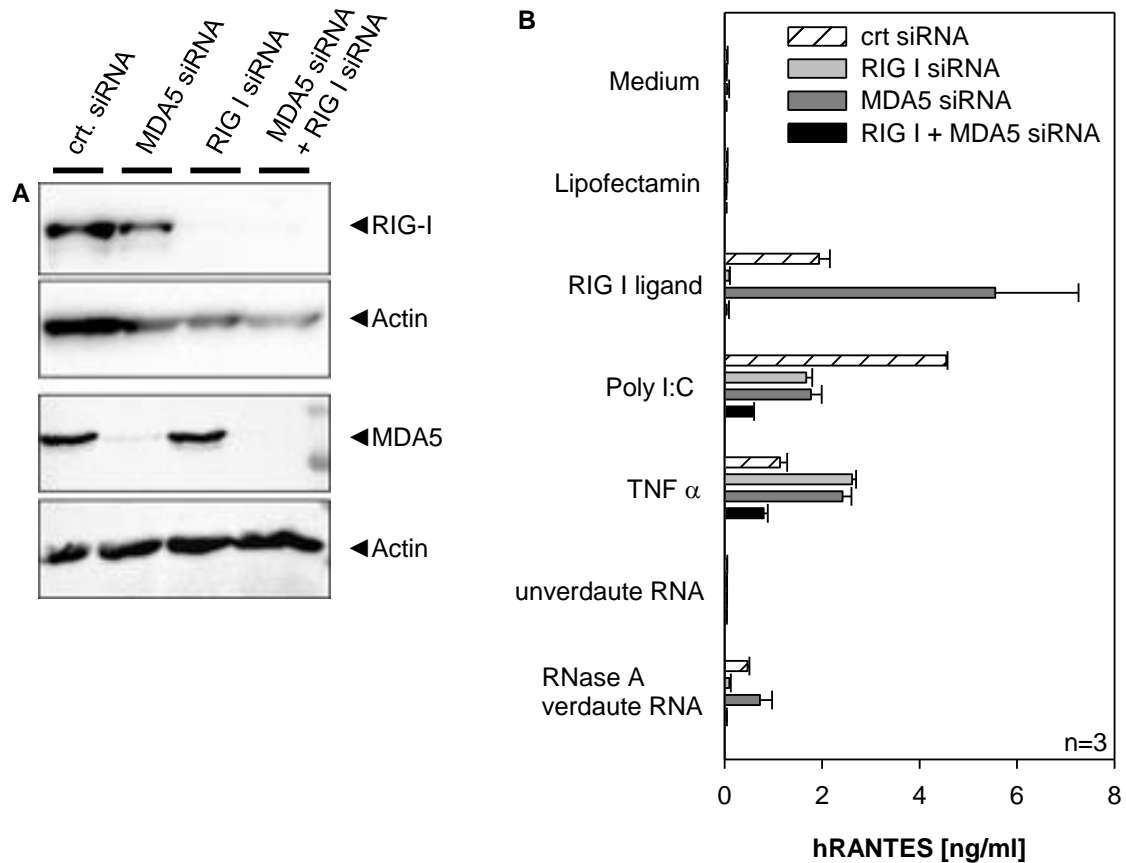


Abbildung 22: Knockdown-Studien identifizieren die immunstimulatorischen Produkte eines RNase A-Verdaus als RIG I Ligand.

A549 Zellen wurden mit RLR-spezifischen siRNAs und crt siRNAs behandelt und an Tag 5 für Experimente eingesetzt. **A) Nachweis des Knockdowns im Western Blot.** Die Proteine wurden im 8%igen PAA-Gel getrennt und wie unter 3.5.7 beschrieben im Western Blot detektiert. **B) Freisetzung von RANTES nach Immunstimulation.** A549 Zellen wurden mit Kontrollen und jeweils 2 μ g/ml RNA stimuliert. Die Überstände wurden 18h p.s. geerntet und im ELISA analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Spezifität der RLR-Abschaltung wurde, wie in Abbildung 22A gezeigt, mittels PAA-Gelelektrophorese (3.5.5) und Western Blot (3.5.7) nachgewiesen. Während RIG I defiziente Zellen tatsächlich nicht mehr auf einen definierten RIG I Liganden reagieren, kann eine Poly I:C vermittelte RANTES-Produktion durch die Abschaltung der RLRs nicht vollständig unterdrückt werden (Abbildung 22B), was in der TLR3-Expression der A549-Zellen begründet ist. Eine RANTES-Aktivierung durch RNase A verdaute RNA konnte nur in RIG I-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden und war nicht von einer MDA5-Expression abhängig. Somit wird durch Verdau mit RNase A ein spezifischer endogener RIG I Ligand (eRL) freigesetzt.

Zur zusätzlichen Verifikation dieser Ergebnisse wurden stabil transformierte Huh7.5 Zellen verwendet. Diese exprimieren im nativen Zustand weder RIG I noch MDA5 (23, 112, 200). Durch stabile Transfektion mit einem der beiden Rezeptoren lässt sich dessen Aktivierung spezifisch nachweisen. Die Huh7.5 Zellen wurden mit Kontrollen sowie verdauter und unverdauter RNA stimuliert. 6 h p.s. wurde die RNA extrahiert und die ISG56-Expression als Maß für die Immunaktivierung mittels qRT-PCR vermessen.

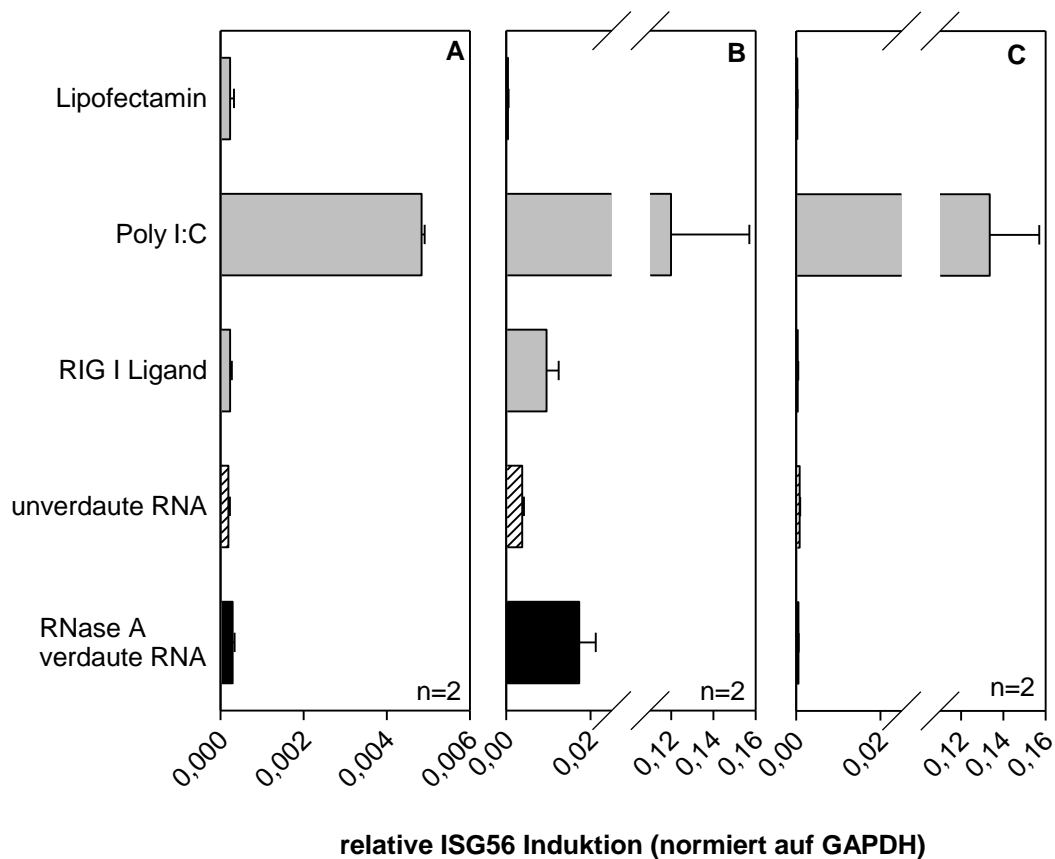


Abbildung 23: Verifikation des RNase A-Verdaus als RIG I Ligand.

Huh7.5 Zellen wurden für 6h mit 5 µg/ml verdauter und unverdauter RNA sowie den angegebenen Kontrollen stimuliert. In einer qRT-PCR wurde die ISG56-mRNA-Expression vermessen und auf die GAPDH-mRNA-Expression geeicht. **A) Huh7.5 Zellen mit Leervektor. B) Huh7.5 RIG I Zellen. C) Huh7.5 MDA5 Zellen.** Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Versuchen.

Wie Abbildung 23B zeigt, stimuliert RNase A verdauter RNA über RIG I, nicht aber über MDA5 (Abbildung 23C). Das auch bereits Huh7.5 Zellen ohne ektopische RLR-Expression (Abbildung 23A) auf Poly I:C reagieren, deutet auf eine basale MDA5-Expression der Zelllinie hin (125, 126, 163). Diese Daten liefern einen weiteren Beleg für die ausschließlich RIG I-aktivierenden Eigenschaften RNase A-verdauter RNA.

4.1.3 Identifikation des endogenen RIG I Ligandes

Es wurden Sequenz und Struktur des endogenen RIG I Liganden ermittelt. Hierzu mussten die immunstimulatorischen Komponenten zuerst angereichert werden, um sie anschließend durch Next Generation Sequencing (NGS) zu identifizieren.

4.1.3.1 Anreicherung des endogenen RIG I Ligandes (eRL)

In Kapitel 4.1.1 war bereits vermutet worden, dass es sich bei dem endogenen RIG I Liganden um eines der längeren Fragmente in dem RNase A-Verdau generierten Gemisch handelt. Besondere Aufmerksamkeit gilt hierbei den als „Bande 1“ bzw. „Bande 2“ bezeichneten Fragmenten. Deshalb wurden verschiedene Versuche unternommen, diese Banden anzureichern.

Die Fragmente wurden mit Hilfe von Gelextraktion aufgereinigt (3.1.4). Da die stimulatorischen Banden in einem Gesamtgemisch nur einen kleinen Anteil ausmachen, wurden sie in der Kontrollstimulation (3.3.7) mit nichtstimulatorischer Rnase A/III verdauten RNA auf eine Endkonzentration von 2 µg/ml aufgefüllt.

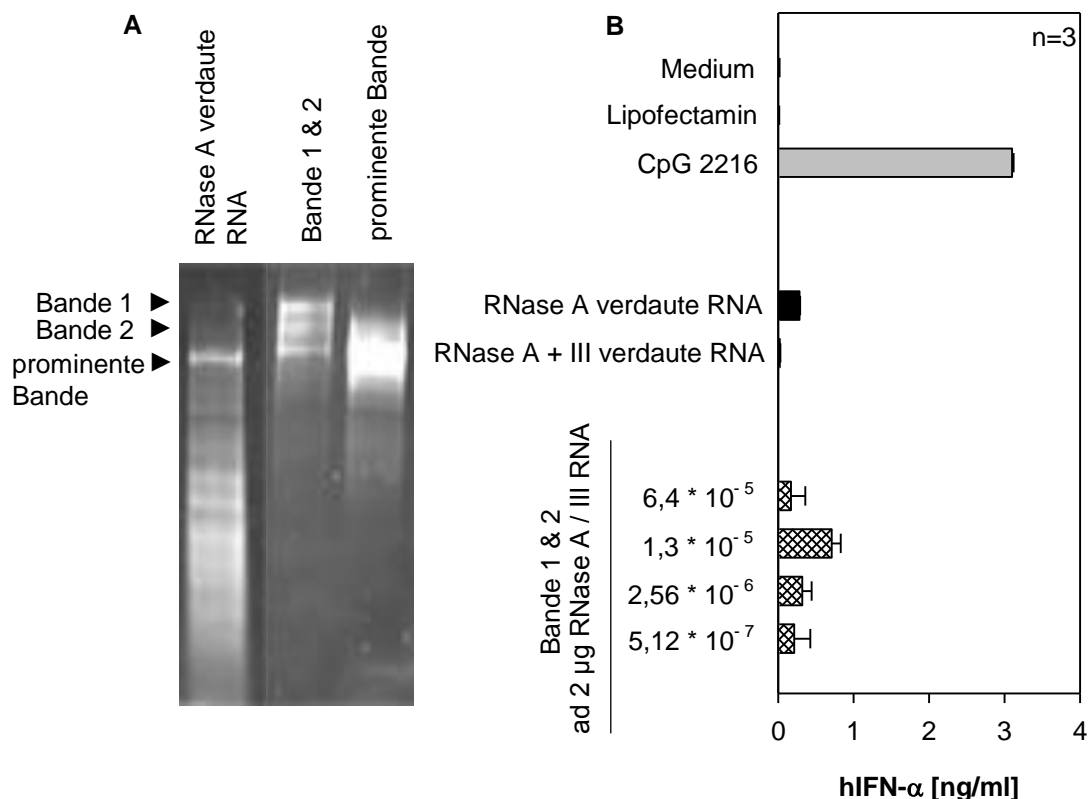


Abbildung 24: Gelextraktionen identifizieren längere RNA-Fragmente als stimulatorische Komponente.

Fractionen eines RNase A-Verdau wurden aus Agarosegelen extrahiert und bezüglich ihrer stimulatorischen Kapazität analysiert. **A) 15%iges PAA-Gel zur Kontrolle der Gelextraktion.** Die Färbung erfolgte in 0,01%iger SYBR-Gold-Lösung. **B) Freisetzung von IFN-α nach PBMC-Immunstimulation.** Humane PBMCs wurden mit Kontrollen, jeweils 2 µg/ml verdauter RNA und den angegebenen Mengen Bande 1&2 aus der Gelextraktion (in µg/ml, aufgefüllt auf 2 µg/ml mit unstimulatorischer Rnase A/III verdauter HEK-RNA) stimuliert. Die Ernte der

Überstände erfolgte 18 h p.s., anschließend wurden diese im ELISA analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie Abbildung 24A zeigt, können sowohl Bande 1&2 als auch die prominente Bande ohne Degradation aus der Gelextraktion gewonnen werden. Allerdings enthält auch die Aufreinigung von Bande1&2 noch Spuren der prominenten Bande, die zumindest zu einem großen Teil die nichtstimulatorische Helix 44 der 18s rRNA enthält (vergleiche 4.1.1). Dieses als „Bande 1&2“ bezeichnete Gemisch verleiht unstimulatorischer, RNase A/III verdauter RNA immunstimulatorische Eigenschaften (Abbildung 24B) und sollte den endogenen RIG I Liganden enthalten.

Um eine bessere Auftrennung im höhermolekularen Bereich und eine schonendere Aufreinigung zu erreichen, wurden die Fragmente im weiteren Verlauf mit Hilfe von NucleoBond-Säulen aufgereinigt (3.2.8) und die einzelnen Fraktionen auf ihre Immunstimulatorischen Eigenschaften untersucht (3.3.7, 3.4.1).

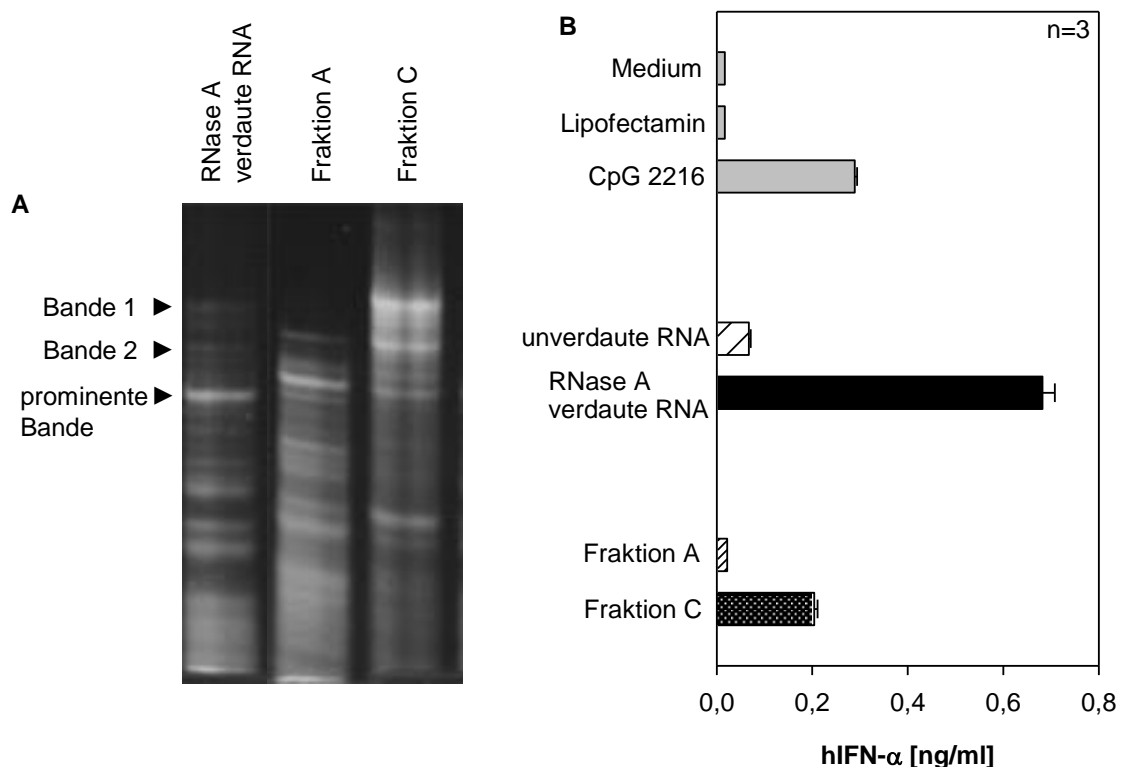


Abbildung 25: Nucleobond-Säulen basierte Aufreinigung identifiziert Bande 1 als stimulatorische Komponente.

RNase A verdaute HEK-RNA wurde über NucleoBond-Säulen hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt. **A) 15%iges PAA-Gel zur Größenkontrolle.** Die Färbung erfolgte mit SYBR-Gold (0,01%). **B) Freisetzung von IFN-α nach Immunstimulation.** Humane PBMCs wurden mit Kontrollen und 0,4 µg/ml RNA stimuliert. Die Ernte der Überstände erfolgte 18 h p.s., anschließend wurden diese im ELISA analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Experimenten.

Das Kontrollgel zeigt eine klare Anreicherung der längeren Fragmente (Abbildung 25A). Während Fraktion A (Elution mit 650 mM KCl) nur Fragmente enthält, die kleiner oder genauso groß wie die Bande 2 sind, enthält Fraktion C (Elution mit 850 mM KCl) auch die längere Bande 1. Im Vergleich zum nichtaufgereinigten Gesamtgemisch (Rnase A verdaute RNA) sind in Fraktion C die Fragmente der Bande 1 und 2 deutlich angereichert und der Anteil kleinerer Fragmente reduziert. Während die Fraktion A ohne Bande 1 nicht immunstimulativ ist, vermittelt Fraktion C mit Bande 1 eine Freisetzung von IFN- α (Abbildung 25B). Folglich muss in der Bande 1 der gesuchte eRL enthalten sein.

4.1.3.2 Sequenzierung der eRLs über Ion Torrent

Die Sequenzierung des endogenen RIG I Liganden wurde von der Firma CeGaT in Tübingen mittels Ion Torrent durchgeführt. Um die stimulatorischen Sequenzen eindeutig zu identifizieren, wurde sowohl stimulatorische RNase A-verdaute als auch nicht-stimulatorische RNase A/III verdaute HEK-RNA sequenziert. Bei Sequenzen, die nur in der stimulatorischen Probe vorkommen, muss es sich um potentielle eRLs handeln. Die Fragmente wurden wie unter 3.2.12 beschrieben aufgereinigt und angereichert. Die Kontrolle der Aufreinigung und Kontrollstimulationen sind in Abbildung 26 gezeigt:

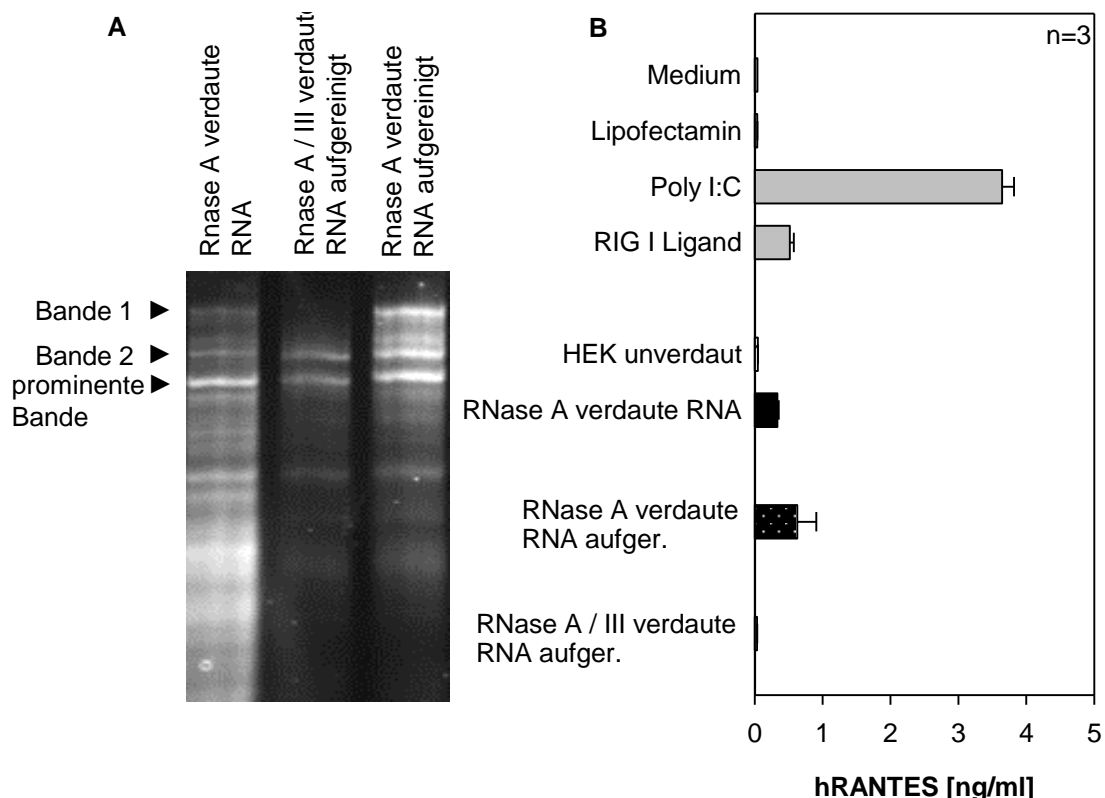


Abbildung 26: Kontrollen der Ion Torrent Proben.

Potentiell stimulatorische größere RNA-Fragmente wurden über Nucleobond-Säulen angereichert. **A) 15%iges PAA-Gel zur Größenkontrolle.** Die Färbung erfolgte mit SYBR-Gold (0,01%). **B) Freisetzung von IFN- α nach Immunstimulation.** A549-Zellen wurden mit Kontrollen und jeweils 2 $\mu\text{g/ml}$ RNA stimuliert. Die Ernte der Überstände erfolgte 18 h p.s.. Anschließend wurden diese im ELISA analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie Abbildung 26A zeigt, wird der Anteil kleiner Fragmente durch die NucleoBond-Aufreinigung im Vergleich zu den nicht-aufgereinigten Proben stark verringert. Die RNase A verdaute RNA besitzt auch noch nach NucleoBond-Aufreinigung ihre stimulatorischen Eigenschaften (Abbildung 26B).

Diese Proben wurden mittels Ion Torrent sequenziert und auf die 45s rRNA gemappt. Da die nichtstimulatorische prominente Bande bereits 44nt lang ist, wurden nur die Sequenzen von mindestens 45 nt Länge weiter beachtet, die in der RNase A-verdauten Probe häufiger als fünfmal gelesen wurden, und mit ihren Häufigkeiten in der RNase A/III verdauten Probe gegenübergestellt. Daraus ergaben sich Gruppen von Sequenzen, die nur in wenigen Nukleotiden in ihrer Start- und Endposition voneinander abweichen. Eine Zusammenfassung dieser Auswertung mit allen Sequenzen, die im RNase A Verdau mindestens 90mal gelesen wurden, ist in Tabelle 16 dargestellt:

Abbildung 16: Sequenzen aus dem NGS (Ion Torrent). Die Sequenzen aus dem NGS wurden gegen die humane 45S rRNA (NCBI Reference Sequence: NR_046235.1) gemappt. Dargestellt sind die häufigsten Sequenzen ≥ 45 nt Länge. Start und Ende bezeichnen ihre Position auf der 45S rRNA. Angegeben sind sowohl die Häufigkeiten der Sequenzen nach Nase A bzw. RNase A/III Verdau als auch der Quotient aus beiden Werten.

Die Sequenzen aus dem NGS wurden gegen die humane 45S rRNA (NCBI Reference Sequence: NR_046235.1) gemappt. Dargestellt sind die häufigsten Sequenzen ≥ 45 nt Länge. Start und Ende bezeichnen ihre Position auf der 45S rRNA. Angegeben sind sowohl die Häufigkeiten der Sequenzen nach RNase A bzw. RNase A/III Verdau als auch der Quotient aus beiden Werten.

Die Sequenzen lassen sich nach ihrer Position auf der 45S rRNA in vier verschiedene Gruppen einteilen. Zwei dieser Sequenzgruppen, welche von der 28S und der 18S rRNA abstammen, treten mit etwa vergleichbarer Häufigkeit in beiden verdauten Proben auf; letztere Gruppe enthält außerdem die Sequenzen der unter 4.1.1 beschriebenen prominenten Bande. Eine in der ITS2 lokalisierte Sequenzgruppe, deren Mitglieder sich zwischen Nukleotid 7217 und 7290 auf der 45S rRNA befinden, tritt fast ausschließlich in der RNase A-verdauten RNA auf, es könnte sich bei ihr also um einen endogenen RIG I Liganden (eRL) handeln. Gleiches gilt für eine weitere Sequenz aus der 28S rRNA (8690-8751 auf der 45S rRNA). Beide Sequenzen haben einen ungewöhnlich hohen GC-Gehalt (79% bei der 28S rRNA- und 76-77% bei der ITS2-Sequenz) und liegen nach den Ergebnissen von RNA-Faltungsprogrammen (mfold und RNAfold [letztere nicht gezeigt aber identisch]) in der 45S rRNA als Duplex mit einem komplementären Gegenstrang vor, der nicht im Ion Torrent detektiert wurde (Abbildung 27).

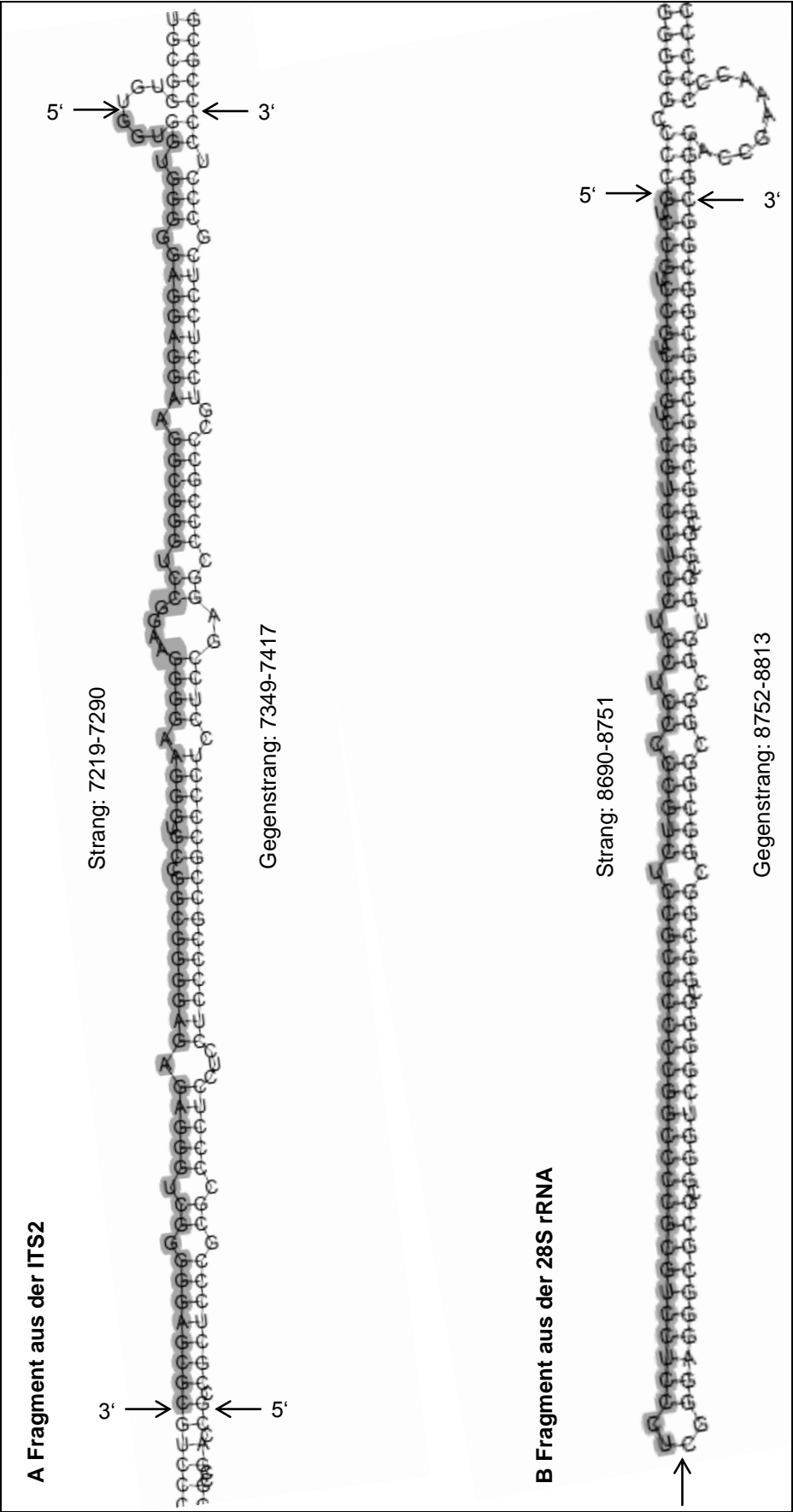


Abbildung 27: Strukturanalyse der potentiellen endogenen RIG I Liganden.
Faltungen der potentiellen eRL mittels mfold. Die im Ion Torrent detektierten Stränge sind grau unterlegt. Schnittstellen sind durch Pfeile markiert, die die 5' bzw. 3' Enden als solche gekennzeichnet. **A) Fragment aus der ITS2. B) Fragment aus der 28S rRNA.**

4.1.3.3 eRL sind nicht als RNA synthetisierbar

Die Synthese der im Ion Torrent detektierten Stränge (ITS2-Strang [7219-7290] und 28S-Strang [8690-8751]) und ihrer korrespondierenden Gegenstränge (ITS2-Geg. [7349-7417] und 28S-Geg. [8752-8813]) wurde bei der Firma Eurofins MWG Operon in Auftrag gegeben. Nach einigen firmeninternen Schwierigkeiten bei der Synthese wurden RNA-Oligos geliefert, die sich als nicht-stimulativ erwiesen (Daten nicht gezeigt). Die Fragmentlänge wurde im denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel überprüft (Abbildung 28). Statt den zu erwartenden klaren Banden definierter Größe zeigte sich ein Gemisch aus verschiedenen langen Banden. Es wird postuliert, dass die gewünschten Sequenzen auf Grund ihres hohen GC-Gehaltes und einer großen Zahl repetitiven Sequenzen nach dem Stand der Technik nicht als RNA herstellbar sind.

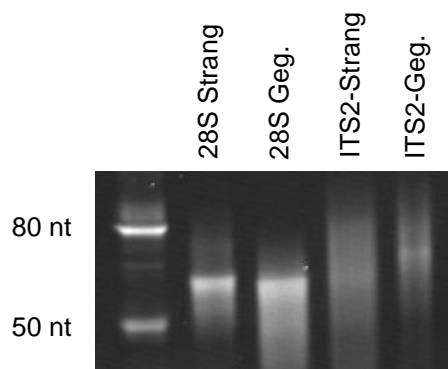


Abbildung 28: Urea-PAA-Gel der synthetisierten RNA-Oligos.

15%iges PAA-Gel zur Größenkontrolle. Die Färbung erfolgte mit SYBR-Gold (0,01%).

4.1.3.4 Verifikation der immunstimulatorischen Aktivität der eRLs

Im weiteren Verlauf wurden die zu untersuchenden RNA-Fragmente als *in vitro* Transkription (IVT) hergestellt (3.2). Hierzu wurden nicht nur die im Ion Torrent detektierten Stränge und ihre korrespondierenden Gegenstränge gewählt, sondern längere Regionen aus der 45S rRNA, die die gewünschten Fragmente beinhalten (zum Vergleich: s. Kapitel 4.1.3.4). Um eine RIG I-Aktivierung durch das 5'ppp der IVT-Produkte zu vermeiden, wurden die RNA-Fragmente im Anschluss an die IVT mit CIP dephosphoryliert (3.2.7), über Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt (3.1.4.3) und erneut dephosphoryliert (3.2.7). Die Reinheit der Proben nach der IVT wurde im Bioanalyzer überprüft (Abbildung 29). Im Bereich der zu erwartenden Längen weisen die Proben eine hohe Reinheit auf. Vereinzelt treten auch kürzere RNA-Oligos auf. Es wurde bereits von der Problematik berichtet, dass durch eine IVT sogenannte copyback-Fragmente entstehen können (185). Diese sind länger als das gewünschte Produkt und führen zu einer unspezifischen RIG I Stimulation. Da copyback-Produkte nicht in der Probe vorliegen, sondern nur zusätzliche kürzere Fragmente, ist nicht mit falsch-positiven Ergebnissen zu rechnen.

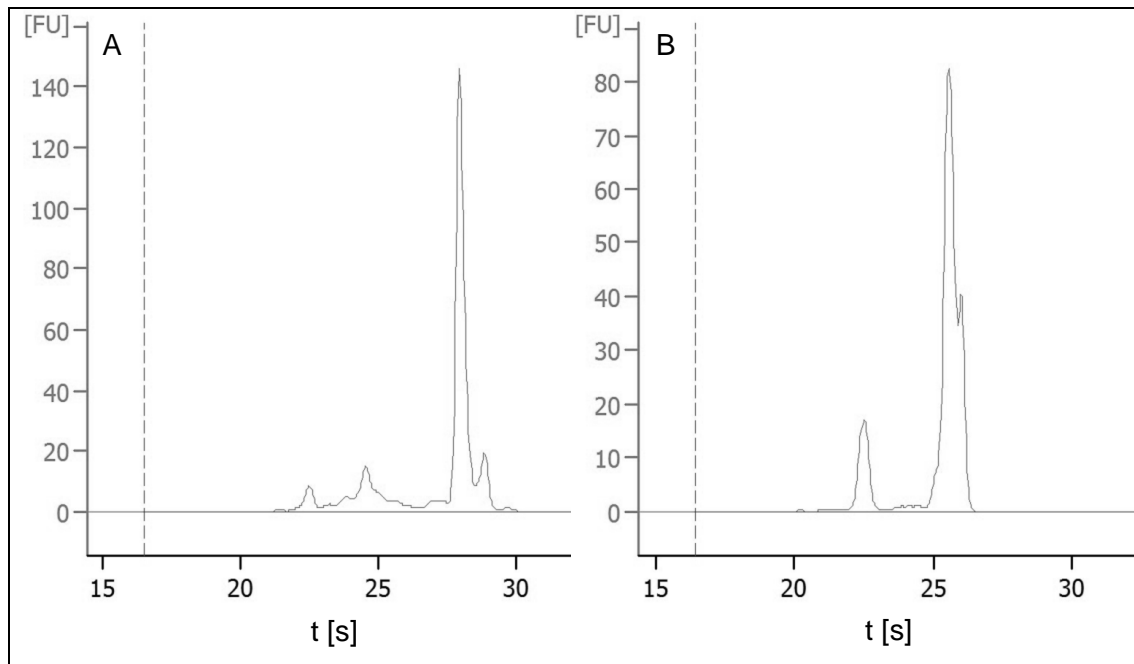


Abbildung 29: Kontrolle der IVTs im Bioanalyser.

Die Proben wurden auf einem 2100 Bioanalyser von Agilent analysiert. Hierzu wurde ein Eukaryote Total RNA Nano Chip verwendet. Die Elutionszeiten sind auf der X-Achse angegeben. **A) Analyse der ITS2-IVT. B) Analyse der 28S rRNA-IVT.**

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob und über welche Rezeptoren die potentiellen eRLs stimulieren. Zu diesem Zweck wurden aus dem Knochenmark von wt-Mäusen sowie TLR379- und IPS-defizienten Mäusen differenzierte Makrophagen generiert (3.6, 3.3). Da für die IVT längere Sequenzen gewählt wurden als im Ion Torrent detektiert, wurden die IVTs zum Teil mit RNase A verdaut, um so die stimulatorischen Fragmente freizulegen. Die Immunstimulation erfolgte somit mit verdauten und nicht-verdauten IVTs (3.3.7). Unspezifische stimulative Effekte durch die IVT wurden durch den Einsatz von Kontroll-RNAs (Abschnitte aus der GAPDH und Tubulin-mRNA sowie aus der 18s und ITS1) ausgeschlossen. Die Überstände der stimulierten Zellen wurden 18h p.s. geerntet und im ELISA (3.4.1) ausgewertet. Die Ernte der Zellen für eine RNA-Aufreinigung zur anschließenden Analyse in der qRT-PCR erfolgte 6 h p.s. .

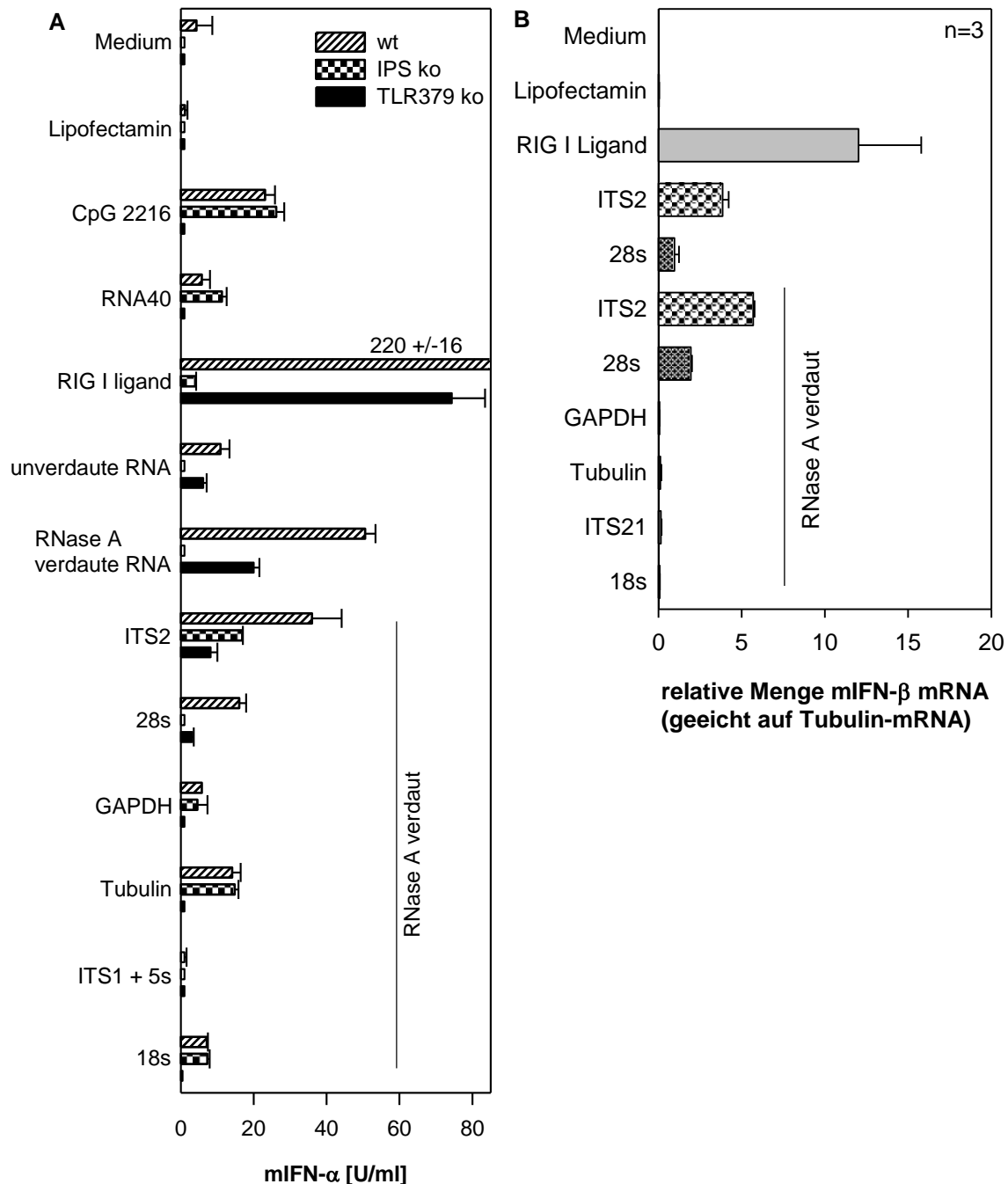


Abbildung 30: ITS2- und 28s-Fragment stimulieren via RLRs.

A) Freisetzung von IFN-α nach Makrophagen-Stimulation. Murine Makrophagen wurden an Tag 5 mit Kontrollen und 2 µg/ml RNA stimuliert. Die Überstände wurden 18h p.s. geerntet und anschließend im ELISA analysiert. **B) Expression von IFN-β mRNA nach TLR379-ko Makrophagen-Stimulation.** Murine TLR379 defiziente Makrophagen wurden an Tag 5 mit Kontrollen und 1 µg/ml RNA stimuliert. Die Lyse der Zellen erfolgte 6h p.s. . Die RNA wurde extrahiert, die mRNA-Expression in einer qRT-PCR quantifiziert und auf die Tubulin-mRNA-Expression geeicht. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Experimenten.

Sowohl die potentiellen eRLs aus ITS2 und 28S rRNA als auch die Kontroll-RNAs (GAPDH, Tubulin, ITS1 + 5S rRNA, Kontrolle 18S rRNA) mit Ausnahme der ITS1-RNA lösen eine IFN-α Freisetzung aus den wt-Makrophagen hervor (Abbildung 30A). Auch in IPS-defizienten Zellen, die nicht mehr auf RLR-Liganden reagieren, kann durch die Kontroll-RNAs eine Immunstimulation ausgelöst werden. Im Gegensatz dazu findet in

den TLR379-defizienten Zellen nur eine Erkennung der potentiellen eRLs, nicht aber der Kontroll-IVTs statt. Da TLR379-defiziente Zellen unter vergleichbaren Bedingungen stets eine geringere Menge IFN- α freisetzen als wt-Zellen, wurde die IFN- β mRNA-Expression der TLR379-Zellen nach Immunstimulation überprüft (Abbildung 30B). Auch in der qRT-PCR zeigt sich, dass es sich bei den Fragmenten aus der ITS2 und der 28S rRNA um Liganden der RLR handelt, bei den Kontroll-IVTs allerdings um TLR-Liganden. Somit konnten die potentiellen eRLs als spezifische RLR-Liganden identifiziert werden. Die RLR-abhängige Stimulation durch unverdaute ITS2-IVT-RNA (Abbildung 30B) hängt vermutlich von der Sensitivität der TLR379-defizienten murinen Makrophagen gegenüber der ITS2-RNA ab, da sie in HEK-RIG I Zellen nicht auftritt (Abbildung 33).

Ob es sich bei den *in vitro* transkribierten Fragmenten aus ITS2 und 28S rRNA um RIG I oder MDA5-Liganden handelt, wurden mit Hilfe stabil transfizierter Huh7.5 Zellen analysiert. Diese wurden mit Poly I:C, verdauter und nicht-verdauter RNA als Kontrolle sowie den *in vitro* transkribierten und RNase A-verdauten IVT-RNAs stimuliert (3.3.7), 6 h p.s. wurde die RNA mittels Trizol extrahiert (3.1.8.1). Die Immunstimulation wurde anschließend über eine qRT-PCR-Analyse nachgewiesen.

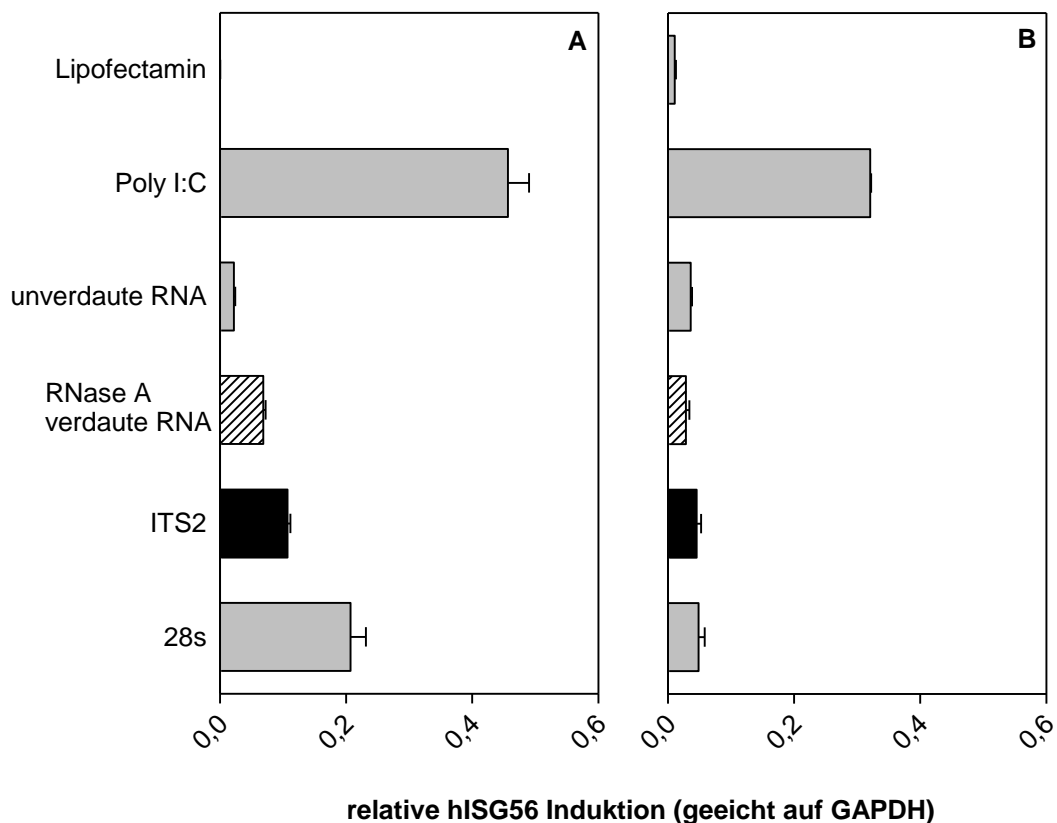


Abbildung 31: ITS2- und 28s-Fragment stimulieren via RIG I.

Huh7.5 Zellen wurden für 6h mit 5 μ g/ml verdauter und unverdauter RNA, 1,5 μ g/ml IVT-RNA, sowie den angegebenen Kontrollen stimuliert. In einer qRT-PCR wurde die ISG56-mRNA-Expression vermessen und auf die GAPDH-mRNA-Expression geeicht. **A) Huh7.5 RIG I Zellen.**

B) Huh7.5 MDA5 Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Versuchen.

Eine Stimulation mit den *in vitro* transkribierten, RNase A-verdauten ITS2- und 28s-Konstrukten führt in den RIG I-exprimierenden Zellen zu einer erhöhten ISG56-mRNA-Expression (Abbildung 31A). Hingegen reagieren MDA5-exprimierende Zellen zwar auf eine Poly I:C vermittelte Stimulation mit einer vergleichbaren ISG56-mRNA-Expression wie RIG I-exprimierende Zellen, nicht aber auf eine Stimulation mit den IVT-Konstrukten (Abbildung 31B). Folglich handelt es sich bei den potentiellen eRLs tatsächlich um RIG I Liganden.

4.1.3.5 Strukturanalyse der potentiellen ITS2-eRL

Nachdem die spezifische RIG I stimulatorische Aktivität der ITS2-Region 7143-7500 bzw. ihrer RNase A-verdauten Produkte nachgewiesen worden war, sollte genauer eingegrenzt werden, welche Bereiche für eine Immunstimulation notwendig sind.

Zuerst wurde überprüft, ob die im Ion Torrent detektierten Fragmente (Tabelle 17) durch RNase A-Verdau aus dem ITS2-IVT-Konstrukt generiert werden. Hierzu wurde RNase A-verdaute ITS2-RNA mittels Adapterligation nach Tuschl (3.2.11) vervielfältigt, in den pJET 1.2 Vektor kloniert (3.1.5.4) und in NEB10ß Zellen transformiert (3.1.6.1). Nach Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (3.1.7.1) wurden einzelne Klone sequenziert (3.1.1.2).

Start	Ende	Länge (nt)
7207	7246	40
7207	7253	47
7207	7240	34
7207	7238	32
7217*	7264	48
7219*	7250	32
7219*	7264	46
7222*	7260	39
7222*	7290*	69

7225	7278	54
------	------	----

Tabelle 18: Sequenzierung der RNase A-generierten Produkte aus der ITS2-IVT (7143-7500).

Zusammenstellung der sequenzierten Fragmente aus der RNase A-verdauten ITS2-IVT. Sequenzen wurden mittels BLAST auf die humane 45S rRNA (NCBI Reference Sequence: NR_046235.1) gemappt. Häufig im Ion Torrent detektierte Schnittstellen wurden mit einem Stern (*) markiert. Dargestellt sind alle Fragmente > 30 bp aus insgesamt 12 Sequenzierungen.

Da es sich bei den hier dargestellten Sequenzen aus einem Gesamtgemisch verdauter ITS2-IVT-RNA handelt, finden sich Sequenzen verschiedenster Längen aus unterschiedlichen Regionen der ITS2-rRNA (Tabelle 18). Da nach Informationen der Herstellerfirma kürzere DNA-Stücke bevorzugt in den pJET-Vektor eingebaut werden, sind die meisten detektierten Fragmente zwischen 30 und 50 bp lang. Auf die Gesamtlänge der IVT-RNA bezogen, treten die im Ion Torrent detektierten Schnittstellen gehäuft auf. Auch das Fragment 7222-7290, welches im Ion Torrent mit 104 Reads detektiert wurde und ein somit ein potentieller eRL ist, wurde in der Sequenzierung detektiert.

Für die weiteren Analysen wurden verschieden lange ITS2-Konstrukte mittels IVT generiert, um die RIG I-stimulatorischen Regionen genauer einzugrenzen. Die verwendeten Konstrukte sind in Abbildung 32 dargestellt.

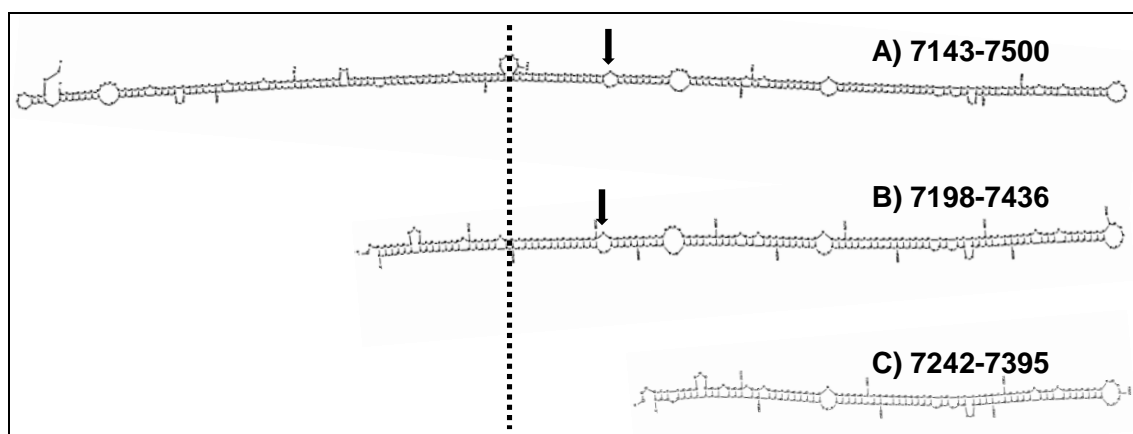


Abbildung 32: Strukturanalyse der verschiedenen ITS2-Konstrukte.

Faltungen der verschiedenen ITS2-Konstrukte mittels mfold. **A) 7143-7500. B) 7198-7436. C) 7242-7395.** Die äußere RNase A-Schnittstelle des eRL ist durch eine gestrichelte Linie markiert, der Pfeil markiert eine loop-Struktur in den Fragmenten 7143-7500 und 7198-7436.

Während das bisher verwendete Konstrukt 7143-7500 (Abbildung 32A, vergleiche auch Abbildung 30 und Abbildung 31) deutlich länger ist als die potentiellen eRLs, ist Konstrukt 7198-7436 (Abbildung 32B) annähernd so lang wie die vermuteten im Ion Torrent detektierten eRLs. Beide RNA-Sequenzen zeigen in der Faltung mittels mfold eine loop-Struktur nahe der äußeren Schnittstelle, die in der Abbildung mit einem Pfeil

markiert ist. Diese loop-Struktur geht im deutlich kürzeren Konstrukt 7242-7395 (Abbildung 32C) verloren.

Die unterschiedlichen Konstrukte wurden zur Stimulation von HEK-RIG I Zellen eingesetzt (3.3.7). Nach Inkubation für 16 h bei 37°C wurden die Zellen lysiert und die IFN- β Aktivierung im Luciferaseassay quantifiziert (3.3.10).

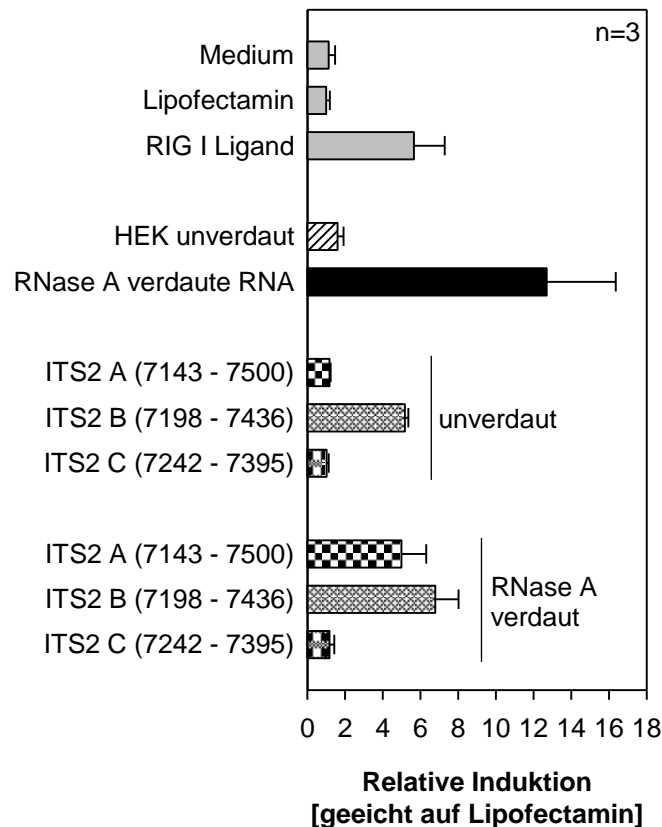


Abbildung 33: Die ITS2-vermittelte Immunstimulation hängt von der Fragmentlänge ab.

HEK-RIG I Zellen wurden mit den genannten Kontrollen, jeweils 2 μ g verdauter bzw. unverdauter HEK-RNA und jeweils 0,4 μ g der verschiedenen ITS2-IVTs stimuliert. 18 h p.s. erfolgte die Lyse der Zellen mit anschließendem Luciferaseassay. Die Werte wurden auf die Firefly-Induktion in den nur mit Lipofectamin behandelten Zellen geeicht. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz zu TLR379-defizienten murinen Makrophagen (Abbildung 30) reagieren HEK-RIG I Zellen weniger empfindlich auf ITS2-RNA. Während das ITS2-Konstrukt 7143-7500 seine RIG I-aktivierenden Eigenschaften erst nach RNase A-Verdau erhält, ist das Konstrukt 7198-7436 per se immunstimulatorisch (Abbildung 33). Da es dem potentiellen eRL aufgrund seiner 5' und 3' Endpositionen auch in ungeschnittener Form stark ähnelt, muss es nicht weiter prozessiert werden. Das Konstrukt ITS2 7242-7395 hingegen, welches eine verkürzte Version des eRL darstellt, besitzt keine immunstimulatorischen Eigenschaften mehr. Für diesen Effekt könnten zwei verschiedene Faktoren verantwortlich sein: denkbar wäre, dass es zu kurz ist, um RIG I zu binden. Es wäre allerdings auch möglich, dass die loop-Struktur, welche durch die Kürzung verloren geht, essentiell für eine RIG I-Aktivierung ist.

Die durch RNase A Verdau entstehenden endogenen RIG I Ligand (eRLs) konnte somit nicht nur nachgewiesen und sequenziert, sondern auch näher charakterisiert werden.

4.2 Untersuchungen zur intrazellulären immunstimulatorischen Aktivität von RNase A

In der folgenden Versuchsreihe wurde RNase A als Protein mit Hilfe des Transfektionsreagenz Saint-PhD ins Zytosol immunkompetente Zellen eingebracht. Damit sollte die Fragestellung untersucht werden, ob RNase A in der Lage ist, auch intrazellulär die Generierung von immunstimulatorischen RNA-Spezies zu verursachen.

4.2.1 Produktion rekombinanter RNase A und Verifikation ihrer immunstimulatorischen Aktivität

Die Proteinexpression von RNase A wurde in mit den entsprechenden Vektorkonstrukten transfizierten BL21-E.coli induziert (3.5.1). Das Protein wurde aus den Einschlusskörperchen aufgereinigt (3.5.2) und über Econo-Pac® 10DG Desalting Columns durch Beseitigung des denaturierenden Lysepuffers zurückgefaltet (3.5.3). Gleichzeitig erfolgte hierbei eine Trennung des RNase A-Proteins von den bakteriellen Proteinen. Aufgrund der unbekannten Migrationseigenschaften des Proteins wurden zur Etablierung zuerst verschiedene Fraktionen à 1 ml gesammelt, bevor die unter 3.5.3 beschriebenen PBS-Volumina verwendet wurden. Die Proteinproduktion und Aufreinigung wurde im SDS-Gel (3.5.5) mit anschließender Comassie-Färbung (3.5.6) überprüft. Freundlicherweise wurde von Stefan Baumeister (Biologie Marburg) ein MALDI-TOF zur Identifikation der Proteine durchgeführt. Das aufgereinigte RNase A-Protein wurde in einer Saint-PhD vermittelten Immunstimulation (3.3.11) eingesetzt.

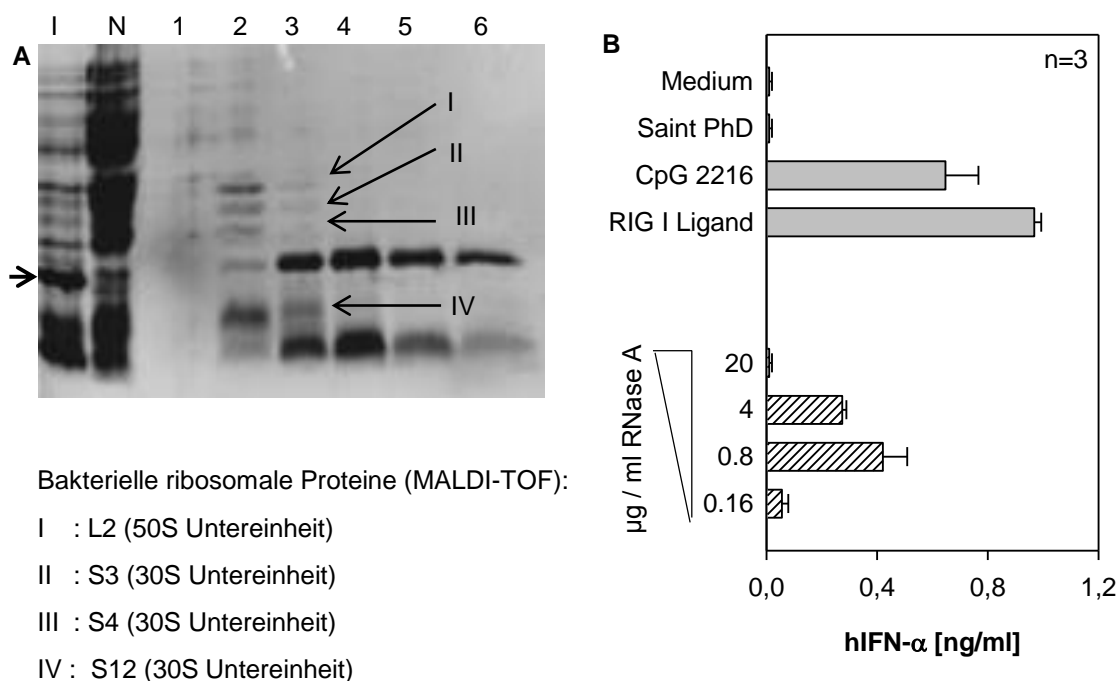


Abbildung 34: RNase A Produktion und Transfektion.

RNase A wurde in BL21-E.coli induziert, aufgereinigt und analysiert. **A) SDS-Gelelektrophorese, Comassie-Färbung und MALDI-TOF-Ergebnisse.** Abkürzungen: L=Lysat

IPTG-induzierter BL21-E.coli; N=Lysat nicht-IPTG-induzierter BL21-E.coli; 1-6: Fraktionen der RNase A-Säulenaufreinigung. Die Laufhöhe der RNase A ist durch einen kurzen Pfeil markiert und die bakteriellen Proteine durch einen langen Pfeil und römische Ziffern. **B) Freisetzung von IFN- α nach PBMC-Immunstimulation.** Humane PBMCs wurden mit Kontrollen und verschiedenen Mengen RNase A stimuliert. 18 h p.s. wurden die Überstände geerntet und mittels ELISA analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie das SDS-Gel (Abbildung 34A) zeigt, wird die Produktion von RNase A durch IPTG induziert (vergleiche Spur I zu Spur N), diese wurde auch im MALDI-TOF identifiziert. Nach der Aufreinigung über die Säulen ist RNase A vorwiegend in den Fraktionen 3 bis 6 enthalten. Da Fraktion 3 Spuren von bakteriellen Proteinen enthält, wird diese verworfen und nur mit den Fraktionen vier bis sechs weitergearbeitet. Die so erhaltene RNase A löst in einer PBMC-Immunstimulation in Abhängigkeit von ihrer Konzentration eine IFN- α Freisetzung aus (Abbildung 34B).

4.2.2 Die RNase A-vermittelte Immunstimulation hängt von der Enzymaktivität ab

Anhand der Ergebnisse aus 4.2.1 lassen sich keine Rückschlüsse ziehen, ob die RNase A-vermittelte IFN- α Freisetzung von der katalytischen Aktivität abhängt oder durch sonstige unspezifische Effekte vermittelt wird. Um dies zu untersuchen, wurden verschiedene RNase A Mutanten erstellt. Der Mutanten für einen Aktivitäts-Knockout (Act ko) fehlen für ihre katalytische Aktivität essentielle Aminosäuren, diese wurden zu Alanin mutiert (zum Vergleich: Kapitel 1.5.2). Um einen optimalen Knockout der RNase-Aktivität zu erreichen, wurden in dieser Arbeit His12Ala Lys41Ala His119Ala Dreifachmutanten verwendet. Die beiden Aminosäuren Asp121 und Gln11 haben ebenfalls einen geringen Einfluss auf die RNase-Aktivität. Da Asp121 außerdem essentiell für die Stabilität der Protein-Konformation ist und Gln11 für die korrekte Bindung des RNA-Moleküls, wurde auf Austausch dieser Aminosäuren verzichtet, um unspezifische Effekte zu vermeiden (167).

Weiterhin sollten unspezifische Effekte durch verschieden hohe RNase A-Inhibitor (RI)-Konzentrationen in den Zellen verhindert werden. Dieser RI liegt im Zytosol vor und inhibiert die RNase A durch eine feste Bindung. Deshalb wurden in dieser Arbeit ebenfalls RI ko Lys7Ala Asn71Ala Glu111Ala Mutanten verwendet, in denen für die RI-RNase A Interaktion essentielle Aminosäuren durch Alanin ersetzt wurden.

Ebenso wie für die wt-RNase A wurden von der Firma Eurofins Plasmide hergestellt, deren Inserts für RNase A, den beschriebenen Aktivitäts-Knockout, den Inhibitor-Knockout oder einem Aktivitäts- und Inhibitor-Knockout kodierten. Analog zu 4.2.1 wurden die Proteine in BL21-E.coli induziert (3.5) und aufgereinigt (3.5.2, 3.5.3). Die RNase-Aktivität der einzelnen Konstrukte wurde im Testverdau (3.2.2) mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese (3.1.1) überprüft. Außerdem wurde ein

Zymogramm (3.5.8) verwendet; hierbei handelt es sich um ein RNA-haltiges Gel, in dem auf der Laufföhe der RNase ein Verdau der RNA stattfindet. Bei nachfolgender Toluidine-Blue Färbung der RNA bleibt die Laufföhe der RNase ungefärbt. Auf diese Weise wurde überprüft, ob die RNA-Degradation tatsächlich auf die RNase A und auf keine sonstige Verunreinigung zurückzuführen ist und ob die Mutagenese des Aktiven Zentrums der RNase A erfolgreich war. Anschließend wurden die verschiedenen RNase-Konstrukte in einer Immunstimulation (3.3.11) mit anschließendem Zytokin-Elisa (3.4.1) eingesetzt.

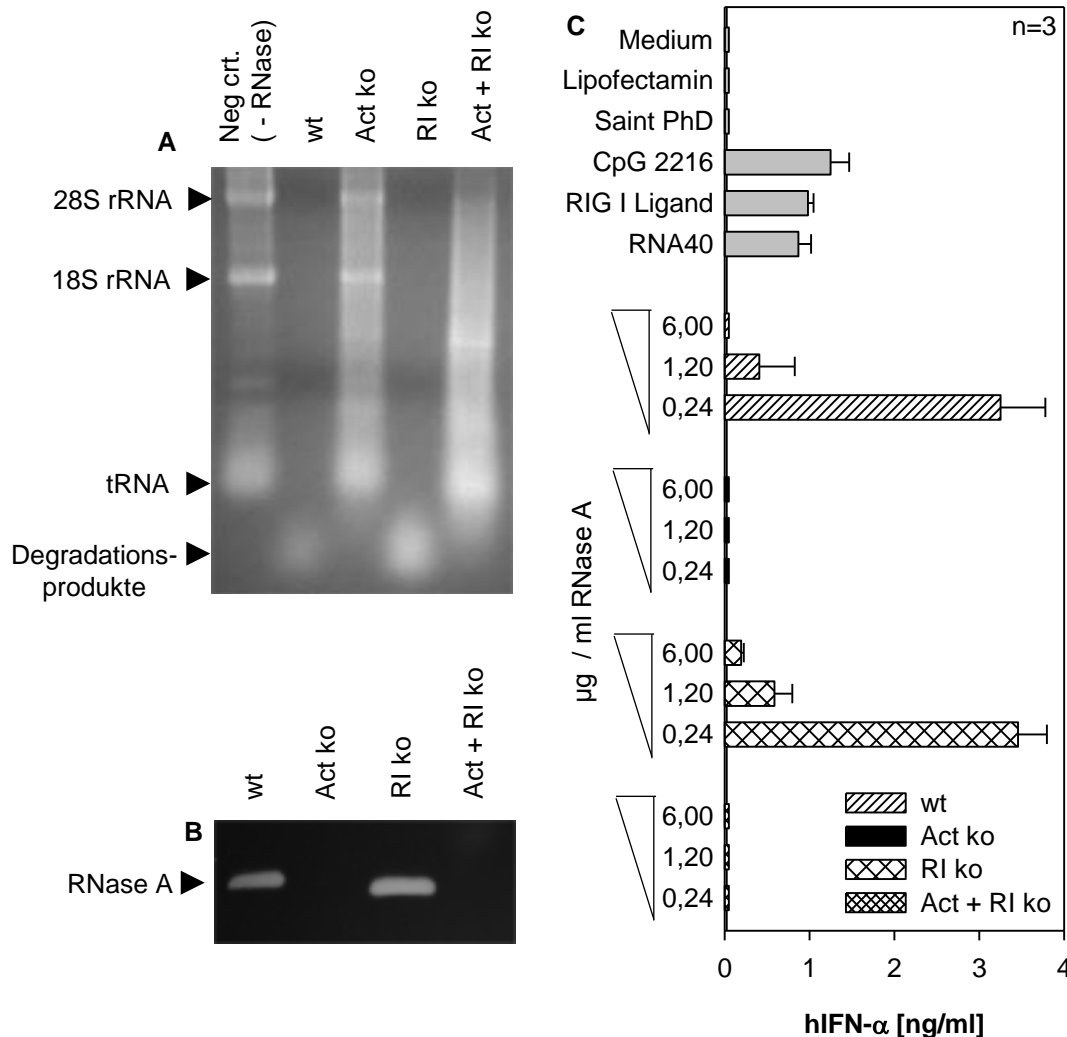


Abbildung 35: Auswirkungen verschiedener RNase A-Mutationen.

A) Testverdau zur Aktivitätskontrolle. Jeweils 5µg Gesamt-RNA wurden mit 50 ng RNase A für 1h bei 37°C inkubiert. Die Integritätskontrolle erfolgte im 1,5%igen Agarosegel mit anschließender Ethidiumbromidfärbung. **B) Zymogramm.** Es wurden jeweils 50ng RNase A pro Spur aufgetragen. Nach Verdau der RNA erfolgte die Färbung in einer 0,2 %igen Toluidine-Blue Färbelösung. **C) Immunstimulation mit den verschiedenen RNase A-Mutanten.** Humane Monozyten wurden mit Kontrollen und steigenden Mengen der RNase A-Mutanten inkubiert. 18 h p.s. wurden die Überstände geerntet und mittels ELISA analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Experimenten.

Während unverdaute RNA ohne Inkubation mit RNase A im Gel eine hohe Integrität aufweist, wird die rRNA durch RNase A-wt oder RNase A-RI ko vollständig verdaut (Abbildung 35A). Die mit RNase A-Act ko und RNase A-Act+RI ko inkubierte RNA

weist eine leicht herabgesetzte Integrität auf, was auf eine geringfügige verbleibende katalytische Aktivität hinweist. Im Zymogramm kann die RNase-Aktivität der Konstrukte ausschließlich im Bereich der RNase A-Banden nachgewiesen werden (Abbildung 35B), was auf eine hohe Reinheit der Proben hinweist. In einer Monozyten-Stimulation lösen ausschließlich die beiden Konstrukte mit RNase-Aktivität (wt und RI-ko) eine IFN- α Freisetzung aus, eine Transfektion mit den beiden RNase-inaktiven Konstrukten (Act-ko und Act + RI ko) hat keine IFN- α Produktion zur Folge (Abbildung 35C). Somit ist das immunstimulatorische Potential intrazellulärer RNase A ausschließlich von der katalytischen Aktivität abhängig.

4.2.3 RNase A generiert intrazellulär immunstimulatorische RNA-Fragmente

Das folgende Experiment diente der Überprüfung, ob die durch intrazelluläre RNase A vermittelte Immunstimulation tatsächlich über entstehende RNA-Fragmente ausgelöst wird. Zu diesem Zweck wurden HEK-Zellen mit RNase A transfiziert (3.3.11), die RNA wurde extrahiert (3.1.8) und zur Immunstimulation mit anschließendem ELISA (3.4.1) eingesetzt.

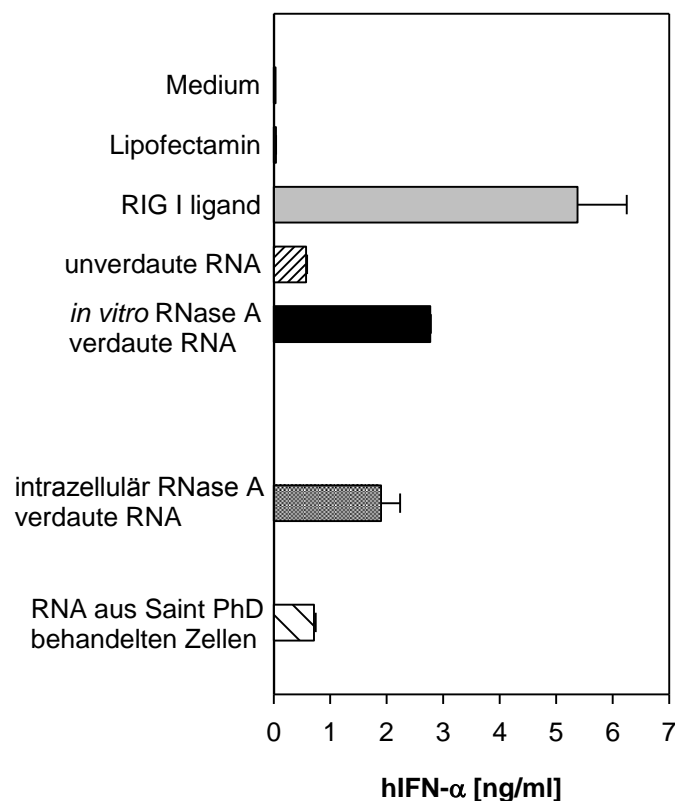


Abbildung 36: PBMC-Stimulation mit RNA aus RNase A-transfizierten HEK-Zellen.

HEK-Zellen wurden mit 50 μ g/ml RNase A bzw. Saint-PhD alleine transfiziert und für 4h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA extrahiert und zur PBMC-Stimulation mit 2 μ g/ml eingesetzt. 18 h p.s. wurden die Überstände geerntet und mittels ELISA analysiert.

Unverdaute RNA und RNA aus Zellen, die nur mit Saint-PhD aber nicht mit RNase A inkubiert worden sind, löst keine IFN- α Freisetzung aus (Abbildung 36). Hingegen hat

sowohl *in vitro* RNase A-verdaute RNA als auch RNA, die intrazellulär durch RNase A verdaut wurde, eine immunstimulatorische Wirkung. Somit führt RNase A auch unter zellulären Bedingungen zur Generierung immunstimulatorischer endogener RNA-Sequenzen.

4.3 Charakterisierung eines spezifischen TLR8-Liganden

4.3.1 Immunstimulation durch verschiedene RNA63-Derivate in humanen PBMCs

Das Oligomer RNA63, das aus der Sequenz der 18S rRNA abgeleitet ist, induziert bei Dotap-vermittelter Transfektion Zytokine (siehe auch Kapitel 1.4.2). Der Einfluss verschiedener Nukleotidmodifikationen auf die RNA63-vermittelte Immunstimulation sollte untersucht werden. Hierzu wurden verschieden modifizierte RNA63-Oligos (RNA63, RNA63 2'-methyl, RNA63 2'-deoxy und RNA63 2'-F) synthetisiert.

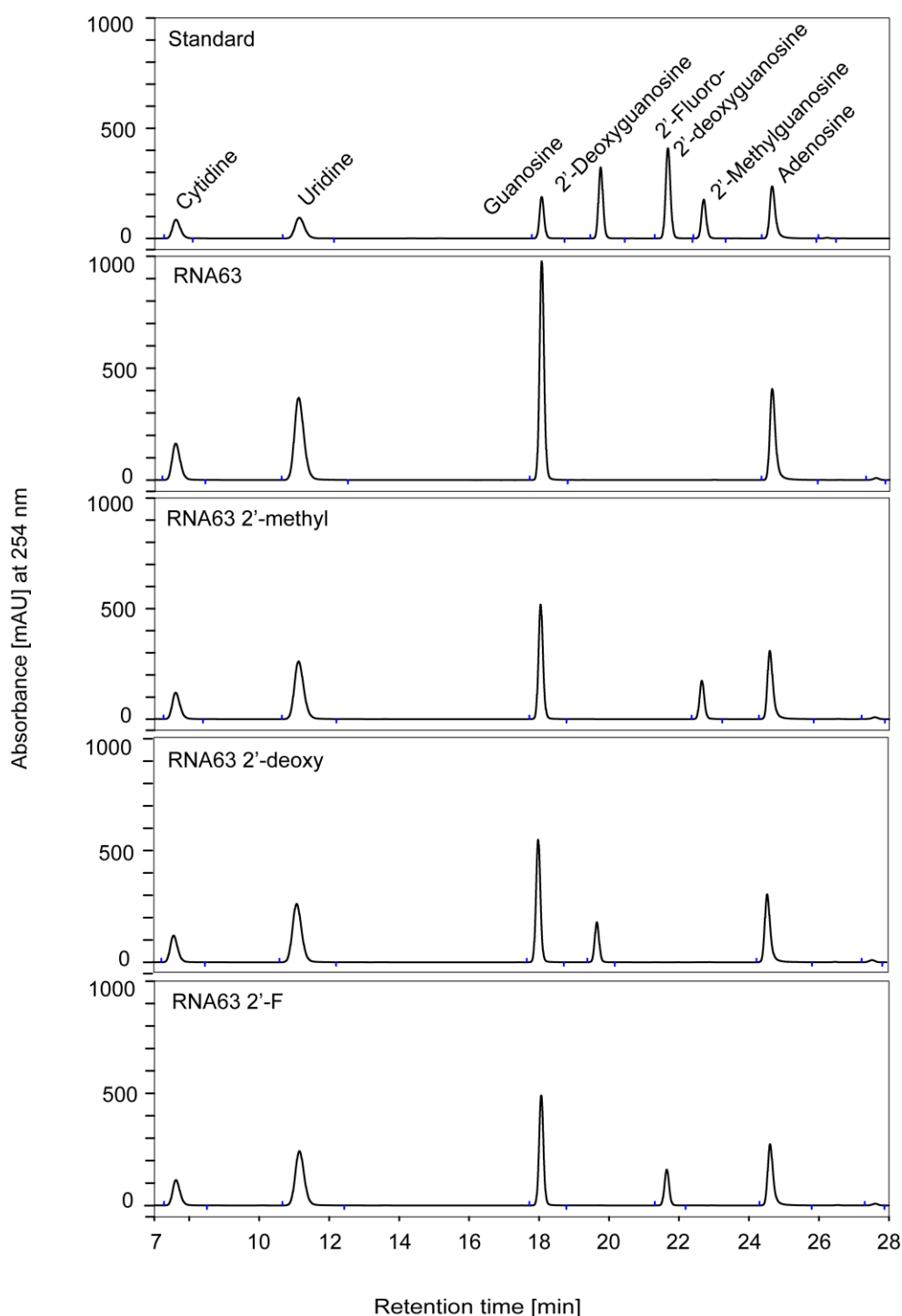


Abbildung 37: Nukleosid HPLC-Analyse verschiedener RNA63-Derivate

In einem HPLC-Lauf wurde in Zusammenarbeit mit Viktoria Laukemper nachgewiesen, dass die RNA-Oligos die Modifikationen enthalten (Abbildung 37).

Um die induzierte Zytokinfreisetzung der verschiedenen RNA63-Derivate zu vergleichen, wurden humane PBMCs mit verschiedenen Konzentrationen RNA63, RNA63 2'-methyl, RNA63 2'-deoxy und RNA63 2'-F stimuliert (3.3.8). Die Ernte der Überstände erfolgte 18 h p.s., anschließend wurden diese im Zytokin-ELISA (3.4.1) eingesetzt.

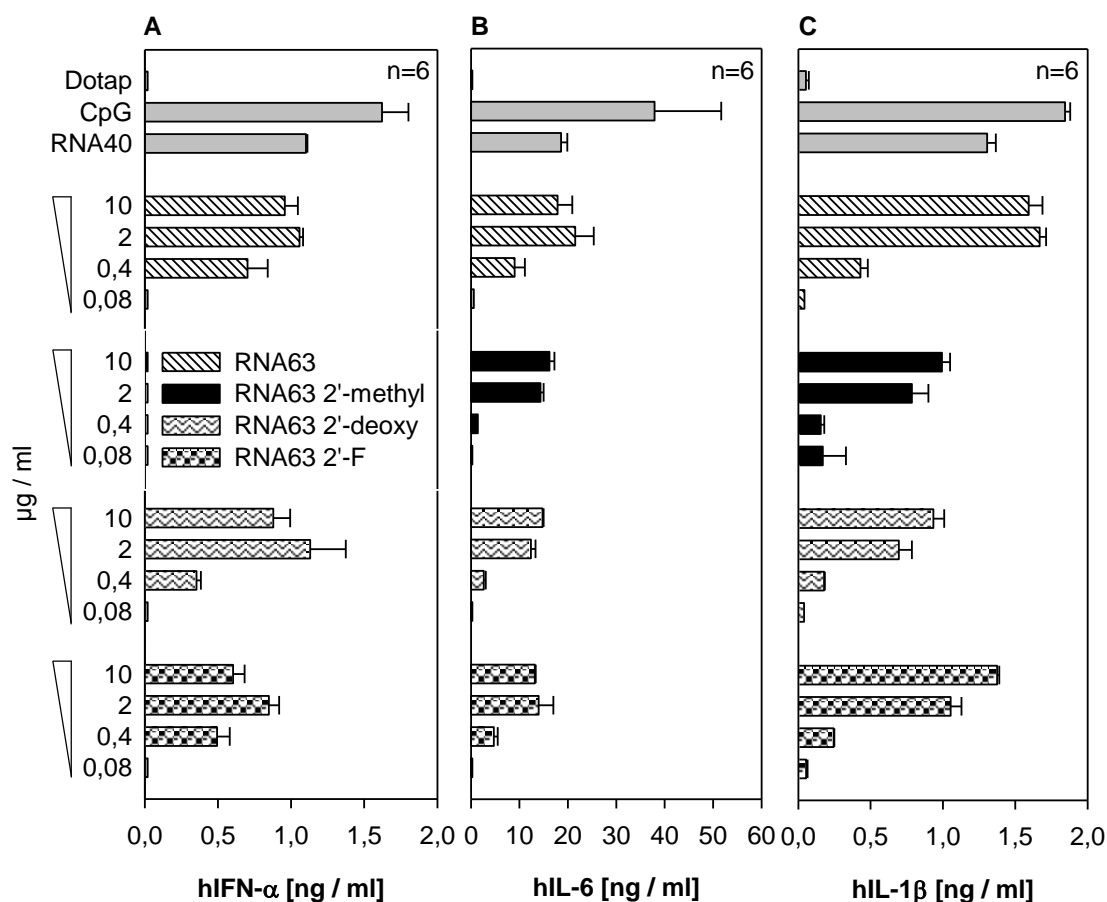


Abbildung 38: Zytokinfreisetzung aus humanen PBMCs nach RNA63 Stimulation. Humane PBMCs wurden mit Kontrollen und verschiedenen Mengen der RNA63-Oligos stimuliert. 18 h p.s. wurden die Überstände geerntet und mittels ELISA analysiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus sechs unabhängigen Versuchen. **A) Freisetzung von IFN-α nach RNA63 Stimulation.** **B) Freisetzung von IL-6 nach RNA63 Stimulation.** **C) Freisetzung von IL-1β nach RNA63 Stimulation.**

Während das unmodifizierte RNA63-Konstrukt und die beiden Fluor- und deoxy-modifizierten Konstrukte eine IFN-α Freisetzung vermittelten, wird diese durch eine Methylierung der RNA63 inhibiert (Abbildung 38A). Hingegen wird die IL-6 Freisetzung durch keine der Modifikationen beeinflusst (Abbildung 38B). Eine Freisetzung des Zytokins IL-1β erfolgt nach Stimulation mit allen RNA63-Oligos, wird jedoch durch die Modifikationen leicht verringert (Abbildung 38C).

4.3.2 Immunstimulation durch verschiedene RNA63-Derivate in murinen pDCs

Das Zytokinprofil der RNA63-stimulierten PBMCs aus 4.3.1 liefert erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der Rezeptoren TLR7 und TLR8. Allerdings ergeben sich keine genaueren Rückschlüsse zur Spezifität. Um die Rezeptorabhängigkeit des RNA63-Signals näher zu untersuchen, wurden Knochenmarkszellen von C57Bl/6 wt und TLR7 defizienten Mäusen auf C57Bl/6 Hintergrund isoliert (3.6) und mit Flt3L zu pDCs differenziert (3.3.3). Die Ernte der Zellen mit anschließender durchflusszytometrischer Kontrolle (3.4.2) (nicht gezeigt) und Dotap-vermittelter Immunstimulation mit allen vier RNA63 Oligos (3.3.8) erfolgte an Tag 7. 18 h p.s. wurden die Überstände geerntet und im ELISA analysiert.

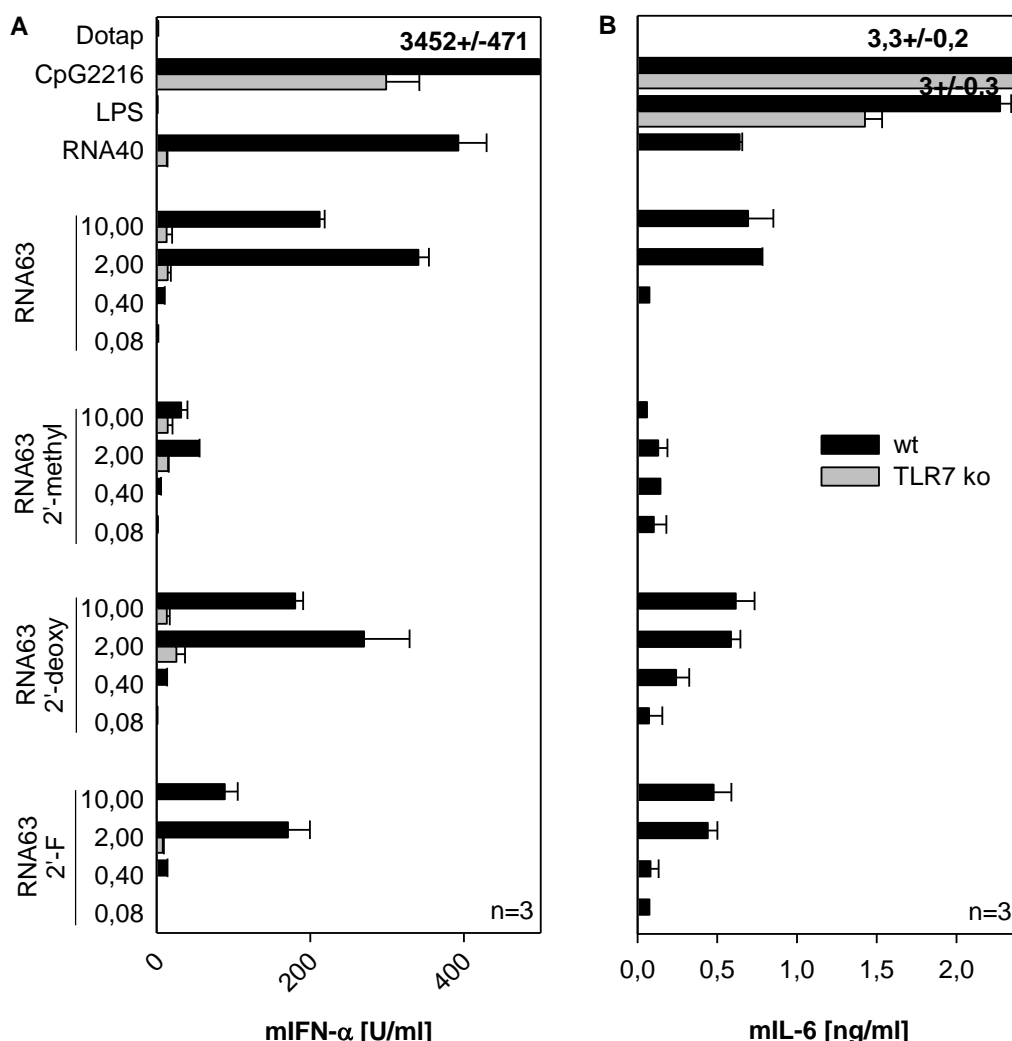


Abbildung 39: Zytokinfreisetzung aus murinen pDCs nach RNA63 Stimulation.

Murine Flt3L differenzierte Knochenmarkszellen wurden mit Kontrollen und verschiedenen Mengen der RNA63-Konstrukte (in µg/ml) stimuliert. 18 h p.s. wurden die Überstände geerntet und mittels ELISA analysiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen. **A) Freisetzung von IFN-α nach RNA63 Stimulation.** **B) Freisetzung von IL-6 nach RNA63 Stimulation.**

Alle RNA63-Konstrukte, bis auf die methylierte Form, führen zu einer Freisetzung von IFN-α und IL-6, wobei diese bei RNA63 2' deoxy und RNA63 2'F leicht reduziert ist (Abbildung 39). Dass die TLR7-defizienten Zellen auf alle RNA63-Oligos nicht mit einer

Zytokinfreisetzung antworten, belegt die Beteiligung dieses Rezeptors an der RNA63 Erkennung. Im Gegensatz zu den humanen PBMCs (vergleiche Abbildung 38) löst RNA63 2'-methyl in den murinen pDCs keine IL-6 Produktion aus, was eine TLR8-vermittelte Erkennung der RNA63 2'-methyl nahelegt (siehe auch Kapitel 1.4.2).

4.3.3 Verifizierung der TLR8-Spezifität von RNA63 2'-methyl

Um die Spezifität des humanen TLR8 für RNA63 2'-methyl zu belegen, wurde die RNA63-vermittelte Reporteraktivität von stabil transfizierten HEK-Blue™ TLR8 Zellen mit der von mit entsprechendem Leervektor transfizierten HEK-Zellen verglichen. Hierzu wurden beide Zelltypen transient mit NF-κB-abhängiger Gaussia-Luciferase transfiziert (3.3.9) und mit den vier RNA63-Konstrukten stimuliert (3.3.8). Um die TLR8-Aktivität zu verstärken, wurde ein Teil der Zellen mit Poly T kostimuliert. Die Lyse der Zellen mit anschließendem Luciferaseassay (3.3.10) erfolgte 16 h p.s. .

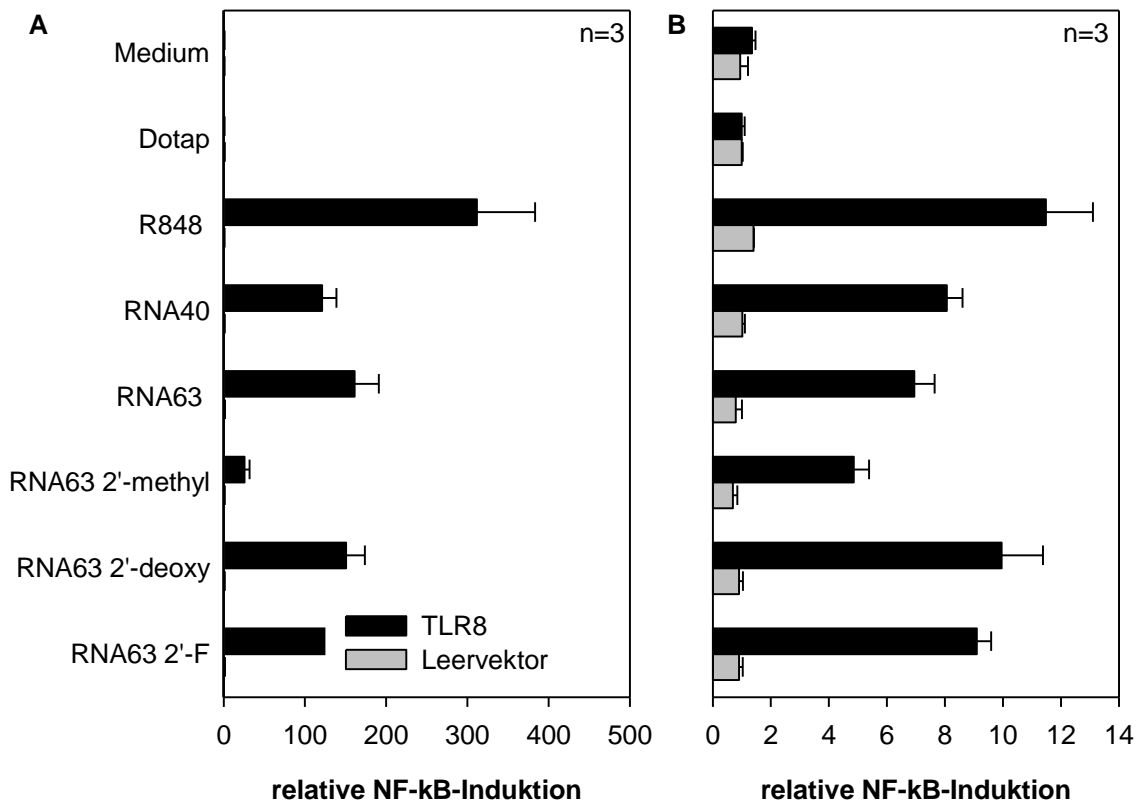


Abbildung 40: Reporteraktivität in HEK-Zellen nach RNA63 Stimulation.

HEK-Zellen wurden mit Kontrollen und jeweils 20 µg/ml der RNA63-Konstrukte stimuliert. 18 h p.s. wurden die Zellen lysiert und mittels Luciferaseassay analysiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen. **A) Gaussia-Aktivität in HEK-TLR8 und HEK-Leervektor Zellen nach RNA63 Stimulation ohne Zugabe von Poly T-PTO.** **B) Gaussia-Aktivität in HEK-TLR8 Zellen nach RNA63 Stimulation unter Zugabe von 1,5 µM Poly T-PTO.**

Alle RNA63-Konstrukte induzieren spezifisch und in Abhängigkeit von TLR8 eine NF-κB-vermittelte Reporteraktivität. In den Leervektorzellen kann dies nicht nachgewiesen werden (Abbildung 40). Bei gleichzeitiger Zugabe von Poly T-PTO ist

die durch RNA63 2'-methyl induzierte NF- κ B-Aktivierung im Vergleich zu den anderen Konstrukten auf etwa die Hälfte abgeschwächt (Abbildung 40B). Ohne Poly T-Zugabe wird die Reporteraktivität durch die RNA63-Methylierung auf etwa ein Sechstel der Ausgangswerte reduziert (Abbildung 40A).

Die analoge Stimulation von HEK-TLR8 Zellen (3.3.8) wurde außerdem ohne vorangegangene Transfektion der Gaussia-Luciferase durchgeführt. Die Überstände wurden 18 h p.s. geerntet und die IL-8-Freisetzung im Zytokin-ELISA gemessen.

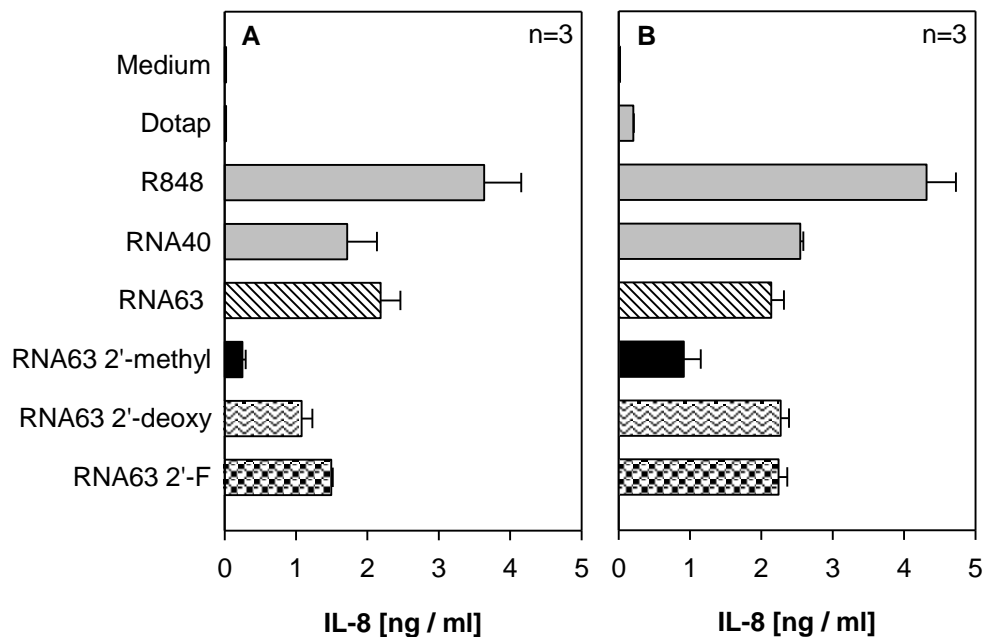


Abbildung 41: IL-8 Freisetzung aus HEK-Blue™ TLR8 Zellen nach RNA63-Stimulation. HEK-Blue™ TLR8 Zellen wurden mit den angegebenen Kontrollen und jeweils 20 µg/ml der RNA63-Konstrukte stimuliert. Die Ernte der Überstände erfolgte 18 h p.s., die IL-8 Konzentration wurde im Zytokin-ELISA bestimmt, gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen. **A) Stimulation ohne Zugabe von Poly T-PTO.** **B) Stimulation unter Zugabe von 1,5 µM Poly T-PTO.**

In den Proben ohne Poly T zeigt sich ein abschwächender Einfluss der RNA63-Modifikationen auf die IL-8 Freisetzung (Abbildung 41A). Die IL-8-Freisetzung wird durch Methylierung der RNA63 auf ein Zehntel reduziert, durch Deoxy- oder Fluor-Modifikation auf die Hälfte. Bei gleichzeitiger Zugabe von Poly T-PTO wird der Einfluss der Modifikationen auf die Zytokinproduktion abgeschwächt (Abbildung 41B). Die methylierte RNA63 stimuliert die IL-8-Freisetzung auf die Hälfte des Ausgangswertes. In den Überständen der RNA63 2'-deoxy und RNA63 2'-F stimulierten Zellen sind vergleichbare IL-8-Mengen wie in den Überständen der RNA63 stimulierten Zellen vorhanden.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der Einfluss zelleigener RNA auf die Immunaktivierung untersucht. Zum einen wurde die Existenz eines endogenen RIG I Liganden bewiesen und dieser charakterisiert. Außerdem wurden erste Schritte unternommen, um die Verwendbarkeit RNase-verdauter RNA als Adjuvans zu untersuchen. Zum anderen wurde untersucht, welchen Einfluss RNA-Modifikationen eines bestimmten Abschnittes aus der 18S rRNA auf die Immunerkennung haben.

5.1 Beschreibung und Charakterisierung endogener RIG I Liganden

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die immunstimulatorischen Eigenschaften von RNase-verdauter RNA untersucht werden. In einer Publikation konnte bereits gezeigt werden, dass in Folge einer Virusinfektion aktivierte RNase L zelleigene RNA in kleinere immunstimulatorische RNA-Fragmente schneidet, welche einen RLR-abhängigen Signalweg aktivieren (139). Es war bisher noch nicht gezeigt worden, ob dies ein unspezifischer Effekt von RNase L-zerschnittener RNA ist oder ob spezifische RLR-Liganden mit bestimmten Eigenschaften durch den RNase-Verdau freigesetzt werden. Außerdem war nicht geklärt, ob die endogene stimulatorische RNA an RIG I, MDA5 oder beide Rezeptoren bindet. Ziel dieses Projektes war, zu untersuchen, ob spezifische endogene RLR-Liganden existieren, sowie ggf. ihre Sequenz und Struktur zu ermitteln. Weiterhin sollte genauer untersucht werden, welche RLRs für die Immunstimulation durch diese Liganden verantwortlich sind.

5.1.1 Bestimmung des verantwortlichen Rezeptors

Wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, führen die durch einen RNase A-Verdau generierten Fragmente ausschließlich zu einer RIG I-vermittelten Immunstimulation. Es wurde keine Abhängigkeit von MDA5 oder RNA-detektierenden TLRs nachgewiesen. Hingegen beobachteten Malathi *et al.* nach intrazellulärer RNase L-Aktivierung auch eine schwache MDA5-abhängige Stimulation (139). Dies kann durch weitere intrazelluläre Effekte des 2'5' Oligoadenylats ausgelöst werden, welche für meine Daten ausgeschlossen sind, da der RNase-Verdau *in vitro* durchgeführt wurde. Eine weitere Ursache für diesen Effekt können die leicht unterschiedlichen Sequenzspezifitäten von RNase A und RNase L sein, sodass auch teilweise unterschiedliche RNA-Spezies geschnitten werden (67, 167, 218). Beispielsweise könnte es sich bei der MDA5-erkannten Sequenz um eine mRNA handeln, da bereits von Luthra *et al.* berichtet wird, dass RNase L aus einer Parainfluenzavirus 5-mRNA einen MDA5-Liganden generiert (134). Vermutlich hat allerdings auf der Ebene der

zelleigenen RNA die ribosomale RNA, zu welcher die von mir gefundenen endogenen RIG I Liganden gehören, (zum Vergleich: s. 4.1.3) aufgrund ihrer Häufigkeit einen größeren Einfluss als bestimmte mRNA-Sequenzen, weshalb die RIG I-Aktivierung gegenüber der MDA5-Aktivierung überwiegt.

5.1.2 Sequenz und Struktur der eRLs

Im Verlauf dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass ein Verdau zelleigener nichtstimulatorischer RNA mit einzelstrangspezifischen RNasen zur Freisetzung spezifischer endogener RIG I Liganden führt (Abbildung 25). Dieser Effekt konnte durch alle getesteten einzelstrangspezifischen RNasen ausgelöst werden und ist somit nicht spezifisch für RNase L (Abbildung 10). Auch wird fragmentierte RNA nicht *per se* von RIG I erkannt, da die stimulatorische Komponente weder durch einen Verdau mit doppelstrangspezifischer RNase III (Abbildung 13), noch durch eine mechanische oder chemische Fragmentierung freigelegt wird (Abbildung 12). Die durch RNase A-Verdau generierte immunstimulatorische RNA-Komponente wird durch einen nachfolgenden RNase III-Verdau beseitigt (Abbildung 14), was einen ersten Hinweis auf die doppelsträngige Natur des endogenen RIG I Liganden liefert. Dies stimmt mit aktuellen Modellen überein, nach denen RIG I nur von RNA mit doppelsträngigen Komponenten aktiviert werden kann (185, 186); hierfür sind Haarnadel-Strukturen ausreichend (215).

Weiterhin wurde die Sequenz der endogenen RIG I Liganden ermittelt. Hierbei handelt es sich um 45S rRNA Abbauprodukte von etwa 60 bis 70 bp, die aus der ITS2 in der Region zwischen Nukleotid 7219 und Nukleotid 7290 und der 28S rRNA zwischen Nukleotid 8690 bis 8751 stammen (Tabelle 17 und Abbildung 42). Während die ITS2 essentiell für die Prozessierung der 45S rRNA ist und während dieser herausgeschnitten wird, liegt das Fragment aus der 28S rRNA in einem Expansionssegment vor. Dieses ist auf der Oberfläche des Ribosoms exponiert und hat keine katalytische Funktion. Diese Fragmente weisen mit 76% im ITS2-Bereich 7219-7290 und 79% im 28S rRNA Bereich 8690-8751 einen ungewöhnlich hohen GC-Gehalt auf. Der GC-Gehalt des humanen Genoms liegt bei etwa 40% (127). Der hohe GC-Gehalt steht im Gegensatz zu Berichten, die eine Abhängigkeit des RIG I Liganden von der Basenzusammensetzung diskutieren. So wurden 5'pppRNAs von 60-100 bp Länge als RIG I Liganden vorgestellt, wenn sie uridinreiche Regionen mit eingestreuten Cytosin-Basen oder adenosinreiche Regionen mit eingestreuten Guanodin-Basen enthielten. GC-reiche Regionen erwiesen sich als nicht stimulatив (179, 189, 211). Andere Publikationen berichten von einer 5'ppp-unabhängigen RIG I Stimulation in

Abhängigkeit von ssRNA und Poly-U-Sequenzen (49, 98). Gestützt werden meine Daten durch die nachgewiesene Erkennung von Poly I:C durch RIG I (110).

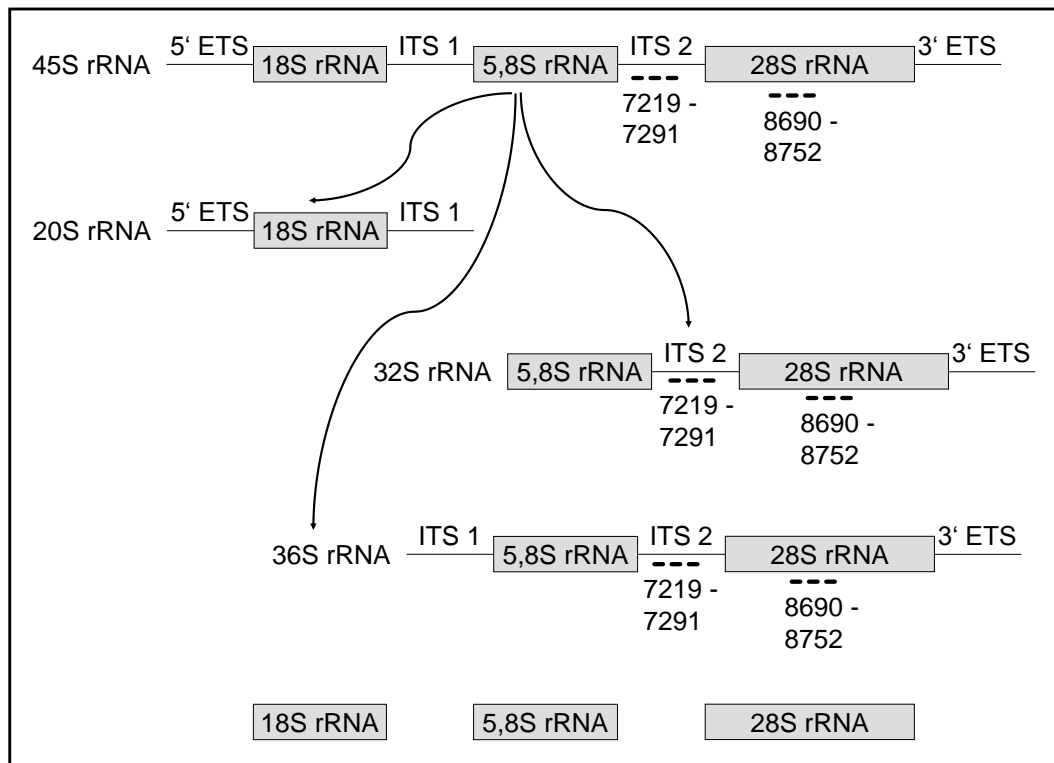


Abbildung 42: Position der eRLs in der 45S rRNA.

Aufgrund des hohen GC-Gehaltes war es nach dem Stand der Technik nicht möglich, die Fragmente als Oligomere chemisch zu synthetisieren (Abbildung 28), weshalb sie über eine IVT hergestellt werden mussten. Über einen anschließenden RNase A-Verdau wurden die im Ion Torrent detektierten Fragmente und ihre komplementären Gegenstränge erhalten. In der Vergangenheit kam es durch den Einsatz von IVTs zu Berichten über RIG I Liganden, die sich später als falsch positiv herausstellten. Ursache war die Verwendung der T7 RNA Polymerase, die neben ssRNA auch dsRNA herstellte, indem sie den synthetisierten Strang erneut abschrieb. Somit entstehen größere Fragmente mit Haarnadel-Strukturen, die auch von RIG I erkannt werden können, solange am 5'ppp-Ende ein doppelsträngiger Bereich von mindestens 10 bp vorliegt (187, 188). Um dieser Problematik zu entgehen, wurden die synthetisierten RNA-Fragmente durch einen Bioanalyser-Lauf kontrolliert (Abbildung 29). Ein unspezifischer Effekt der IVT-RNA wurde durch die Verwendung von ebenfalls RNase A-verdauten Kontroll-RNAs (GAPDH, Tubulin, ITS1 und 18S rRNA) ähnlicher Länge ausgeschlossen. Eine unspezifische Stimulation durch die 5' Phosphorylierung der IVT-Produkte wurde durch zweifache Dephosphorylierung der *in vitro* transkribierten RNAs verhindert. Während die Kontrollen eine Immunstimulation über die RNA-detektierenden TLRs 3 und / oder 7 hervorrufen, stimulieren die Fragmente aus der ITS2 und der 28s ausschließlich über RIG I (Abbildung 30).

Es ist anzunehmen, dass die stimulativen Eigenschaften der eRLs von ihrer Struktur abhängen. Diese eRLs sind vermutlich doppelsträngig, weshalb sie durch Verdau mit RNase III zerstört werden (vergleiche Abbildung 14 und Abbildung 15). Die stimulatorischen Sequenzen wurden im Ion Torrent nur als Einzelstränge detektiert, liegen in der 45S rRNA allerdings als dsRNA mit einem komplementären Gegenstrang vor (vergleiche 4.1.3.2); die Problematik der vorhandenen aber nicht in der Sequenzierung detektierten Gegenstränge war bereits nach der Klonierung von RNA-Fragmenten mittels Adapterligation aufgetreten (zum Vergleich: s.Kapitel 4.1.1.3). Die hypothetischen Gegenstränge sind in den Bereichen 7349 – 7417 für das ITS2-Fragment und 8752 – 8813 für das 28S rRNA-Fragment zu vermuten.

Die Lage eines RNase A-generierten eRL in der ITS2-Sequenz konnte genauer eingegrenzt werden, hierbei ist allerdings die unterschiedliche Sensitivität verschiedener Zelltypen gegenüber unverdauter ITS2-RNA zu beachten (vergleiche Abbildung 30 und Abbildung 33). Während das deutlich längere Fragment ITS2 A (7143-7500) in HEK-RIG I Zellen seine volle RIG I-stimulierende Aktivität nur durch RNase A-Verdau erhält, ist das Fragment ITS2 B (7198-7436) mit ähnlicher Länge wie der im Ion Torrent sequenzierte eRL per se immunstimulatorisch (vergleiche Abbildung 33). Das stärker verkürzte Fragment ITS2 C (7242-7395) kann keine RIG I-abhängige Immunstimulation hervorrufen. Es bleibt zu zeigen, ob lediglich die Länge des ITS2-Fragment entscheidend ist oder ob auch die hypothetische loop-Struktur, welche durch die Kürzung im nicht stimulativen ITS2 C (7242-7395) Fragment verloren geht, eine Funktion in der Immunstimulation hat. Interessanterweise rufen Sequenzen aus der 18S rRNA bzw. die prominente Bande nach RNase A Verdau trotz ähnlicher Länge (44nt) wie die eRLs keine RIG I-abhängige Immunstimulation hervor (Abbildung 18).

Ein RIG I Ligand, der durch RNase L aus dem HCV Genom generiert wird, konnte bereits identifiziert werden (140). Ebenso wie die von mir identifizierten eRLs liegt auch der RIG I Ligand aus dem HCV-Genom als Doppelstrang mit kleineren loop-Strukturen vor und weist einen hohen GC-Gehalt von 60% auf. Das Fragment selbst ist mit 91 nt Gesamtlänge und 33 bp Doppelstrangstruktur kürzer als die von mir identifizierten Fragmente. Dies ist ein neben den Experimenten mit verschiedenen langen ITS2 weiterer Beleg dafür, dass Strukturelemente wie Doppelsträngigkeit und loop-Strukturen wesentlich für die Erkennung durch RIG I sind, während die genaue Länge oder Sequenz des RNA-Liganden eher eine untergeordnete Rolle spielen.

Cooper *et al.* (46) erstellten eine cDNA-Bibliothek verschiedener RNase L-Produkte, ohne diese jedoch auf ihre immunstimulatorischen Aktivitäten zu testen. Im Gegensatz zu unseren Daten fanden sie keine Schnittstellen in den GC-reichen 28S rRNA-Expansionssegmenten, in denen auch das von uns sequenzierte Fragment 8690-8751 liegt. Fragmente und Schnittstellen in der ITS2 wurden nicht in die Daten mit einbezogen.

5.1.3 Intrazelluläre Generierung der eRLs

Aus den bisherigen Erkenntnissen ergibt sich die Frage, unter welchen Umständen und in welchen Zellorganellen es zur Generierung der eRLs kommen kann. Für das Fragment 8690-8751 und seinen korrespondierenden Gegenstrang ist diese eindeutig zu beantworten: Dieses Fragment liegt im Bereich B des Expansionssegmentes ES7L der 28S rRNA (10). Somit liegt es exponiert auf der äußeren Oberfläche der Ribosomen und ist RNasen zugänglich (10).

Über den Entstehungsweg von Fragmenten aus der Region ~7219-7290 in der ITS2 lässt sich nur spekulieren. Nach den meisten aktuellen Daten sollte es nicht im Zytoplasma vorkommen, da es in Folge der 45S rRNA-Prozessierung herausgeschnitten und abgebaut wird (87, 151, 209). Allerdings erfolgt dies nicht sofort nach Transkription der 45S rRNA; die Halbwertszeit der ITS2 beträgt mehr als 30 Minuten (123) und erst 4h nach Hemmung der rRNA-Synthese mit Quarfloxin können keine pre-rRNA Spezies mehr nachgewiesen werden (60). Es wäre also möglich, dass RNase L in den Kern translokalisiert wird (6) und dort die eRLs generiert. Der Transportweg des ITS2-eRL aus dem Kern ins Cytoplasma, wo dieser an RIG I binden kann, wäre noch zu ermitteln.

Allerdings konnte ITS2 auch im Cytoplasma nachgewiesen werden, wie z.B. in Nucleolus-derived Foci (NDF) während der Mitose (61, 194). Auf diese Weise ist die ITS2 direkt der RNase L und im nachfolgenden Schritt der generierte Ligand auch RIG I zugänglich.

Weiterhin ist bemerkenswert, dass die beiden Fragmente aus ITS2 und 28S rRNA auch zueinander komplementär sind (Abbildung 43). Möglicherweise lagern sich die durch 45S rRNA-Prozessierung frei werdenden ITS2-Fragmente noch während der rRNA-Transkription an ihre komplementären Bereiche in der 28S rRNA (8690-8751) an, bevor sich diese mit ihrem Gegenstrang zusammenlagern können. Durch eine Aktivierung der kerngängigen RNase L (6) könnte es somit zum Herausschneiden einer aus ITS2 7219-7290 und 28S rRNA 8690-8751 Doppelstrang-RNA kommen, die als eRL fungiert. Da nach RNA-Extraktion sowohl ITS2 als auch 28S rRNA vorliegen, ist dies ebenfalls *in vitro* möglich.

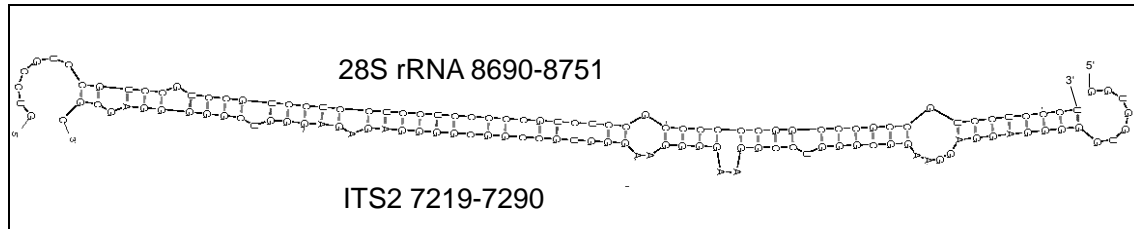


Abbildung 43: Die 45S rRNA Fragmente ITS2 7219-7290 und 28S rRNA 8690-8751 sind komplementär.

5.1.4 Modifikationen der eRLs

Das für eine RIG I Stimulation erforderliche Phosphorylierungsmuster ist umstritten.

Hornung *et al.* präsentieren 5'ppp als absolut essentiell für eine RIG I-Aktivierung (93), allerdings kann auch 5' Monophosphat (5'p)-RNA wie beispielsweise Poly I:C RIG I aktivieren (110, 202). Produkte eines einzelstrangspezifischen RNase-Verdaues aktivieren ebenfalls RIG I, obwohl sie eine 5' Hydroxygruppe (5'OH) und ein 3' Monophosphat (3'P) tragen (140).

Takahasi *et al.* schlagen vor, dass RNA mit einem 5' Monophosphat zu einer RIG I Stimulation führen kann, da sie stabiler ist als unphosphorylierte RNA (202). Dies gilt auch für die in dieser Arbeit vorgestellten eRLs, da diese aufgrund ihres hohen GC-Gehaltes eine hohe Schmelztemperatur und eine hohe Stabilität gegenüber RNasen haben.

Auch sonstige Modifikationen hemmen eine RIG I-Aktivierung. Wenn eine potentiell stimulatorische RNA posttranskriptionelle Modifikationen wie Pseudouridin, Thiouridin und 2'-O-Methylierungen trägt, deutet dies auf einen zellulären und nicht viralen Ursprung hin und wirkt sich inhibitorisch auf die RIG I-Stimulation aus (93, 211). Die hier beschriebenen eRLs sind sehr wahrscheinlich nicht modifiziert, denn RNA-Modifikationen finden in erster Linie in funktionellen Regionen und somit nicht in Expansionssegmenten und internen transkribierten Spacern („internal transcribed spacers“, ITS) statt (15, 50, 137, 224). Die nichtstimulatorische prominente Bande aus 44mer und Gegenstrang hingegen trägt eine 2'-O-Ribose-Methylierung (Abbildung 16). Das 44mer alleine kann aufgrund seines hohen Uridingehaltes eine TLR7-Aktivierung auslösen (Abbildung 18) (55), liegt im natürlichen Zustand allerdings als Duplex mit

dem methylierten Gegenstrang vor (Abbildung 16). Somit stimuliert es weder über RIG I noch über TLR7 (Abbildung 18), da eine TLR7-Aktivierung durch dieses Methylierungsmuster gehemmt wird (55, 84, 103, 206). Zwar wird ein signifikanter Anteil 44mer Moleküle nicht mit dem Gegenstrang zusammengelagert und liegt zusätzlich zu den Doppelsträngen in jeder Probe vor, doch eine Bindung dieser freien Moleküle wird durch die festere Bindung methylierter RNA an den TLR7 verhindert (84).

5.1.5 Evolutionäre Konservierung der eRLs

Die Generierung zelleigener immunstimulatorischer RNA-Fragmente nimmt eine zentrale Rolle in der Virusabwehr ein (139), weshalb sich die Frage stellt, ab welcher evolutionären Ebene die eRLs konserviert sind. So kann nicht nur verdaute RNA humaner sondern auch tierischer Zelllinien eine Immunstimulation hervorrufen (Abbildung 19). Bemerkenswerter Weise unterscheidet sich allerdings das Bandenmuster der verdauten RNA tierischen Ursprungs vom Bandenmuster humaner RNA, auch sind die Sequenzen ~7219-7290 und 8690-8751 spezifisch für humane rRNA. Dies kann darin begründet sein, dass zwar die Struktur und der GC-Gehalt von ITS2 und Expansionssegmenten konserviert sind, nicht aber Sequenz und Länge (45, 86, 104, 192). Da für die Generierung eines eRL in erster Linie strukturelle Elemente verantwortlich zu sein scheinen, bleiben diese Eigenschaften trotz Variabilität erhalten.

5.1.6 eRLs und Krebs

Neben ihrer Rolle als positive Feedback-Signale zur Detektion von Virusinfektionen (139) könnten die eRLs auch als Tumorsupressor fungieren. Da die ITS2 eine Halbwertszeit von Minuten bis wenigen Stunden hat (60) und rRNA-Synthese in erster Linie während Zellwachstum und Proliferation stattfindet (60, 88), liegt die eRL ~7219-7290 enthaltende ITS2 vorwiegend in proliferierenden Zellen wie beispielsweise Tumorzellen vor. In diesen Zellen könnten stimulatorische Fragmente durch eine RNase L-Aktivierung generiert und über RIG I erkannt werden. Da RIG I auch Apoptose induziert (36, 71, 161), kann der ITS2-eRL so direkt die Entstehung von Tumoren hemmen. Passend dazu ist bekannt, dass eine RNase L-Defizienz die Morbidität für bestimmte Krebserkrankungen erhöht (29, 152) und auch RIG I ist als Tumorsupressor bekannt (97). Sollte eine der beiden Komponenten ausfallen, ist eine Generierung bzw. Erkennung des eRL nicht mehr möglich.

Falls sich diese Hypothese bewahrheitet, sollte sie bei bestimmten Krebstherapien beachtet werden. So ist bekannt, dass das Krebstherapeutikum Cisplatin die

Polymerase I-abhängige rRNA Transkription hemmt (60). Dies verhindert zwar eine Zellproliferation, allerdings kann so auch keine eRL-Generierung stattfinden.

5.1.7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten RNase A generierte eRLs nachgewiesen und charakterisiert werden. Bisherige Versuche erfolgten allerdings stets *in vitro* und nicht *in vivo*. Es bleibt zu zeigen, ob die identifizierten Fragmente aus ITS2 und 28S rRNA während einer Virusinfektion von der intrazellulären RNase L generiert werden. Hierzu muss eine geeignete Nachweismethode gefunden werden, da die eRLs aufgrund ihres hohen GC-Gehaltes und großen Anteil an repetitiven Elementen nicht mittels stem-loop PCR (3.2.10) spezifisch nachgewiesen werden können und nur spezielle Polymerasen und Pufferbedingungen (3.1.2) für die Vervielfältigung dieser Sequenzen geeignet sind. Denkbar ist der Nachweis der Fragmente mittels NGS, hierbei sollten Proben aus virusinfizierten und nicht-virusinfizierten Zellen miteinander verglichen werden.

Aufgrund der hohen Kosten dieser Methode sollte im Vorfeld getestet werden, ob sich die eRLs über eine semiquantitative PCR nachweisen lassen. Hierzu sollten zwei Primersets gewählt werden: Ein Set bindet im Bereich der zu quantifizierenden Sequenzen und weist sowohl deren geschnittene als auch deren ungeschnittene Form nach. Das zweite Set bindet nicht im Bereich der eRLs sondern flankierender Bereiche. Eine erhöhte Menge eRLs sollte sich somit aus einer steigenden Ratio (geschnittene Form + ungeschnittene Form) / (flankierende Bereiche) nachweisen lassen.

Sobald eine entsprechende Nachweismethode für die eRLs vorliegt, ist in klinischer Hinsicht die Überprüfung interessant, ob sie in bestimmten Tumoren in veränderter Anzahl vorkommt. Möglicherweise ist dies der Grund, aus dem mit RNase A erste Erfolge in der Krebstherapie erzielt werden konnten (14, 184). Hierbei wird die kationische Onconase von den Tumorzellen durch Endozytose aufgenommen und gelangt so ins Zytoplasma (11).

Weiterhin sollte die Struktur der eRLs genauer charakterisiert werden. Zwar wurden die stimulatorischen Bereiche in der ITS2 eingegrenzt (4.1.3.5), doch weder die exakten Schnittstellen der RNase A noch die minimalen Anforderungen an einen eRL sind bisher bekannt. Besonderes Interesse gilt an dieser Stelle der loop-Struktur, welche in einer verkürzten nichtstimulatorischen ITS2 nicht mehr enthalten ist (zum Vergleich: Kapitel 4.1.3.5). Die Rolle der loop-Struktur für die RIG I Aktivierung sollte in weiteren Arbeiten genauer untersucht werden.

5.2 Immunstimulatorisches Potential intrazellulärer RNase A

Im Anschluss an die Charakterisierung der eRLs sollte untersucht werden, ob RNase A nicht nur *in vitro* immunstimulatorische RNA-Spezies generieren kann, sondern auch intrazellulär. Auf lange Sicht soll im murinen System getestet werden, ob RNase A als neue Adjuvansspezies etabliert werden kann, worüber bis heute nichts bekannt ist. Auch wurde die Onconase, ein Mitglied der RNase A Superfamilie, bereits erfolgreich als Krebstherapeutikum getestet (14, 184), doch bisher konnte noch nicht definitiv geklärt werden, wie die Onconase wirkt und welche RNA-Spezies ihr Hauptziel ist (11).

5.2.1 Charakterisierung des immunstimulatorischen Potentials intrazellulärer RNase A

Wie in

Abbildung 34 gezeigt, führt eine Transfektion des RNase A-Proteins ins Zytoplasma der Zelle zu einer IFN- α Freisetzung. Womöglich liegt hierbei ein Mechanismus zugrunde, der einer RNase L-vermittelten Immunstimulation gleicht (139). Beide RNasen haben einige Gemeinsamkeiten: Sie sind einzelstrangspezifisch und generieren 5' hydroxylierte und 3' monophosphorylierte Produkte, auch schneiden sie nach ähnlichen Basenabfolgen (67, 167, 218). Somit könnten beide RNasen immunstimulatorische RNA-Fragmente in der Zelle generieren. Um auszuschließen, dass die Aktivierung der Immunzellen nicht durch die katalytische Funktion der RNase A, sondern durch andere Eigenschaften des Proteins ausgelöst wird, wurden verschiedene RNase A-Konstrukte hergestellt und in die Zellen transfiziert (zum Vergleich: Kapitel 4.2.2). Tatsächlich kann nur aktive, nicht aber enzymatisch inaktive RNase A eine IFN- α Freisetzung auslösen. An dieser Stelle zeigt sich allerdings ein Widerspruch zum Testverdau (Abbildung 35A), in dem auch die RNasen mit mutiertem katalytischen Zentrum (Act ko und Act RI ko) eine schwache Restaktivität aufweisen. Diese Restaktivität ist vermutlich durch den Einfluss der Aminosäuren Asp121 und Gln11 bedingt, die ebenfalls schwach an der katalytischen Aktivität der RNase A beteiligt sind. Da sie außerdem für die Konformationsstabilität des Enzyms selbst verantwortlich sind, wurde auf eine Mutagenese dieser beiden Aminosäuren verzichtet (167).

Zudem war vermutet worden, dass die Bindung des zellulären Inhibitors die intrazelluläre Aktivität der RNase A herabsetzen würde (54, 178), weshalb zusätzlich Inhibitor-resistente RNase A-Mutanten getestet wurden. Entgegen unserer Annahme vermittelt das Inhibitor-resistente Konstrukt keine höhere Immunstimulation als das die wt-RNase A. Ob dies durch einen Überschuss aktiver RNase A gegenüber dem

Inhibitor oder durch eventuelle zelltypspezifische, besonders niedrige Inhibitor-Konzentrationen in den verwendeten humanen Monozyten (82) bedingt ist, ist bisher noch nicht geklärt.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Immunaktivierung durch intrazelluläre RNase A tatsächlich auf RNA-Basis stattfindet. Zu diesem Zweck wurde die RNA aus RNase A-transfizierten HEK-Zellen isoliert und in PBMCs transfiziert (zum Vergleich: Kapitel 4.2.3). Dies hat eine IFN- α Freisetzung zur Folge.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass RNase A intrazellulär immunstimulatorische RNA-Fragmente generiert. Es liegen bisher keine Informationen über den für diesen Effekt verantwortlichen Rezeptor vor, auch wenn anhand vorangegangener Arbeiten zum eRL postuliert wird, dass es sich hierbei um RIG I handelt. Bei dem stimulatorischen Fragment handelt es sich vermutlich um das Fragment 8690-8751 aus der 28S rRNA, da auch in nicht-proliferierenden PBMCs eine Immunstimulation erzielt werden konnte, die keine oder nur sehr wenig ITS2-Sequenzen enthalten. Auch sind zytoplasmatische Expansionssegmente leichter zugänglich als die vorwiegend im Kern lokalisierte ITS2.

5.2.2 Hypothesen zur Verwendbarkeit von RNase A als Adjuvans

Durch die Verwendung von Adjuvantien soll die Wirksamkeit eines Impfstoffes gesteigert werden. Auf diese Weise können auch hochreine rekombinante Antigene eingesetzt werden, die zwar eine höhere Impfsicherheit als abtötete oder abgeschwächte Pathogene aufweisen, aber auch weniger effizient sind (172). Auch lässt sich über die Wahl eines geeigneten Adjuvans die nachfolgende adaptive Immunantwort gezielt beeinflussen, sodass das Pathogen optimal abgewehrt werden kann.

In diesem Zusammenhang wurden insbesondere Agonisten der TLRs als Adjuvans für Impfungen gegen schwach immunogene Antigene erfolgreich getestet (44). Weiterhin ermöglichen TLR-Liganden eine Impfung von Patienten, bei denen eine erfolgreiche Immunisierung durch gesundheitliche Faktoren, wie beispielsweise fortgeschrittenes Alter, erschwert ist (116).

Während bei der Verwendung von DNA-Liganden die Gefahr einer Splenomegalie besteht, ist dies für RNA-Liganden nicht bekannt (83). Ein Nachteil von ssRNA-Adjuvantien ist, dass sie ein Transfektionsreagenz benötigen, um in die Zelle zu gelangen. Auch werden sie relativ schnell abgebaut und können so nur ein schwaches Signal auslösen (83). Eine Immunisierung mit RNase A als Wirkverstärker kann komplett auf Proteinebene stattfinden. Es müssen also nicht die unterschiedlichen

Eigenschaften einer Nukleinsäure und eines Proteins beachtet werden, was die Handhabung erleichtert. Erst intrazellulär würde das Effektormolekül, d.h. das stimulatorische RNA-Fragment, generiert, was auch die Wirkdauer und die Effizienz der Impfung steigern sollte.

Die bisher getesteten RNA-Adjuvantien aktivieren vorwiegend endosomale TLRs (44). Im Fall einer Impfung gegen zytoplasmatisch replizierende Viren ist die Nutzung eines Adjuvans sinnvoller, welches ebenso wie die viralen Genome zur Aktivierung der zytoplasmatischen RLRs führt. Sollte eine intrazellulär transfizierte RNase A einen eRL generieren, kann die Verwendung von RNase A als Adjuvans äußerst erfolgreich sein.

5.2.3 Ausblick

Bevor intrazellulär transfizierte RNase A als Adjuvans eingesetzt werden kann, muss ihr Wirkmechanismus umfassend geklärt werden. Zu allererst müsste der für die Immunaktivierung verantwortliche Rezeptor ermittelt und das induzierte Zytokinprofil analysiert werden. Weiterhin sollte die Verwendbarkeit von RNase A als Adjuvans im murinen System anhand von RIG I-defizienten und wt-Mäusen getestet werden. Hierbei wird nicht-immunogenes Ovalbumin als Antigen verwendet, die Immunisierung und der Nachweis wird wie von Hamm *et al.* (83) beschrieben durchgeführt. Da eine Impfung mit ssRNA-TLR-Agonisten als Adjuvantien keine T_h1 Immunantwort auslösen konnte (83), gilt es hierbei insbesondere zu prüfen, ob dieser Effekt mit einer RNase A basierten Impfung erreicht werden kann.

5.3 Umwandlung einer TLR7-aktivierenden RNA in einen spezifischen TLR8-Liganden durch 2'-O-Methylierung

In diesem Projekt sollte die Aktivierung von TLR7 und 8 durch einzelsträngige RNA untersucht und ein spezifischer TLR8-Ligand ermittelt werden. Um einen alleinigen TLR8-Liganden, der TLR7 nicht aktiviert, zu generieren, kommen sowohl bestimmte Basenzusammensetzungen als auch bestimmte Modifikationen in Frage. Beispielsweise wurden GU-reiche Sequenzen aus der U5 Region der HIV-1 RNA (RNA40) sowohl als Agonist für TLR7 als auch für TLR8 identifiziert. Bei Austausch der Guanosinnukleoside durch Adenosinnukleoside entsteht ein spezifischer TLR8 Ligand (RNA42) (90). Hingegen berichten Hornung *et al.*, dass siRNAs bestimmter Sequenzen unabhängig von ihrem GU-Gehalt zu einer TLR7-abhängigen IFN- α Produktion führen; eine TLR8-Aktivierung wird in dieser Publikation nicht beschrieben (94).

An dieser Stelle galt das besondere Interesse der unterschiedlichen Sensitivität der TLRs gegenüber Modifikationen. Eine 2'-O-Methylierung hemmt eine Aktivierung des TLR7, die Aktivierung des TLR8 wird hingegen weniger durch Methylierungen beeinträchtigt (84, 103, 206). Als Modell-RNA wurde RNA63 gewählt. Sie besteht aus einem 12mer der Nukleotide 1488-1499 der humanen 18S rRNA. Da die 18S rRNA eine 2'-O-Methylierung an Position 1490 trägt (15, 136), wurde neben dem unmodifizierten Konstrukt auch das Konstrukt RNA63 2'-methyl mit einem methylierten Guanosin auf Position 3 synthetisiert. Außerdem wurden RNA63-Konstrukte mit Fluor- und Deoxy-Modifikationen auf derselben Position eingesetzt. Diese Modifikationen werden in der gezielten RNA-Interferenz eingesetzt, um Stabilität und Effizienz von siRNAs zu erhöhen (27, 41, 63).

5.3.1 Unmodifizierte und 2'-methylierte RNA63 induzieren unterschiedliche Zytokinschemata

Um den Einfluss von RNA-Modifikationen auf die Immunstimulation zu untersuchen, wurden humane PBMCs mit verschiedenen modifizierten RNA63-Konstrukten stimuliert (Abbildung 38). Während die drei Konstrukte RNA63, RNA63 2'-deoxy und RNA63 2'-F eine vergleichbare IFN- α Produktion auslösen, ist diese nach Stimulation mit RNA63 2'-methyl nicht detektierbar. Im Gegensatz dazu kann nach Stimulation mit allen vier RNA63-Oligos eine vergleichbare IL-6 Freisetzung gemessen werden, und auch die IL-1 β Level unterscheiden sich nur geringfügig. Dies liefert einen ersten Hinweis auf die Involvierung verschiedener Rezeptoren: TLR7 löst die Freisetzung von IFN- α und IL-6 aus, TLR8 stimuliert lediglich die Produktion proinflammatorischer Zytokine (18, 74, 90). Während RNA63, RNA63 2'-deoxy und RNA63 2'-F also das charakteristische Zytokinschema von TLR7 und TLR8-Liganden aufweisen, deutet die alleinige IL-6 Freisetzung durch RNA63 2'-methyl nur auf eine TLR8-Aktivierung hin.

Die TLR7-Abhängigkeit der RNA63, RNA63 2'-deoxy und RNA63 2'-F vermittelten Signale zeigt sich auch im murinen System (Abbildung 39). Diese drei RNA-Oligos lösen eine IFN- α und eine IL-6 Produktion durch pDCs, welche aus dem Knochenmark von wt-Mäusen generiert wurden, aus. pDCs von TLR7-defizienten Mäusen hingegen reagieren auf keines dieser RNA63-Konstrukte mit einer messbaren Zytokinproduktion. An dieser Stelle zeigt sich, dass die RNA63 abhängige Immunantwort in murinen pDCs alleine vom TLR7 abhängt, da der murine TLR8 nicht funktional ist (106). Aus dem selben Grund kann RNA63 2'-methyl als potentieller TLR8-Ligand keine IL-6 Freisetzung aus murinen pDCs auslösen (Abbildung 39B). Bei RNA63 2'-methyl handelt es sich also definitiv nicht um einen TLR7-Liganden.

5.3.2 2'-O-methylierte RNA63 ist ein spezifischer TLR8-Ligand

Die TLR8-Abhängigkeit der verschiedenen RNA63-Konstrukte kann durch Komplementationsexperimente bestätigt werden. Hierzu wurden stabil transfizierte HEK-Blue™ TLR8 Zellen verwendet, in denen alle vier RNA63-Konstrukte in Abhängigkeit von NF- κ B die Expression einer Gaussia-Luciferase als Reporterkonstrukt bzw. die Freisetzung von IL-8 induzieren (Abbildung 40 und Abbildung 41). Gleiches lässt sich in Zellen, die nur mit einem Leervektor transfiziert wurden, nicht beobachten, was die Spezifität dieser Signale belegt. Die durch RNA63 2' methyl ausgelöste NF- κ B-Aktivierung fällt schwächer aus als durch die anderen RNA63-Konstrukte. Dies liegt darin begründet, dass auch die Ligandenerkennung des TLR8 durch Methylierungen gehemmt wird, wenn auch nicht vollständig (108). Durch eine Kostimulation mit Poly T-PTO, welches die Aktivierung des TLR8 verstärkt (75), lässt sich dieser Unterschied verringern.

Da die Rekonstitution von TLR7 in HEK-Zellen nur beschränkt möglich ist und die Zellen zwar auf R848, nicht aber auf sonstige RNAs reagieren (90), lässt sich auf diese Weise nicht zeigen, dass RNA63 2'-methyl kein TLR7-Ligand ist.

5.3.3 Ausblick

Die gezielte Konvertierung eines TLR7 / TLR8 Liganden in einen alleinigen TLR8-Liganden lässt sich unter anderen zur gezielten Immunmodulation einsetzen. Da TLR7 in erster Linie von pDCs und B-Zellen exprimiert wird, TLR8 hingegen von Monozyten (38), ließe sich auf diese Weise auch auf therapeutischem Wege die Immunantwort in eine gewünschte Richtung beeinflussen.

Da rRNA aus Säugerzellen signifikant häufiger modifiziert ist als prokaryotische RNA, kann die Zelle auf diesem Wege den Ursprungsort der RNA erkennen (108). Daraus

ergibt sich die Frage, ob rRNA aus nekrotischen Zellen ebenfalls über den TLR8 erkannt wird und somit zumindest teilweise die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine auslöst (176). Zumindest für Tumorzellen ist bekannt, dass diese gezielt miR-21 und miR-29a in Exosomen sekretieren und auf diesem Weg eine Aktivierung des TLR8 auslösen (65). Mit Hilfe definierter TLR8-Liganden ließen sich also auch der Zusammenhang zwischen Rezeptoren der angeborenen Immunität, Tumorgenese und proinflammatorischen Zytokinen untersuchen.

Immunerkennung endogener RNA-Liganden

Das angeborene Immunsystem verfügt über eine Vielzahl keimbahnkodierter Rezeptoren, die pathogenspezifische Muster erkennen und so eine Immunantwort auslösen können. Verantwortlich für die Detektion doppelsträngiger RNA im Zytoplasma ist die Familie der RIG I ähnlichen Rezeptoren, zu der u.a. RIG I und MDA5 gehören; im Endosomen wird doppel- und einzelsträngige RNA durch die Toll-ähnlichen Rezeptoren („Toll like receptors“, TLRs) 3, 7 und 8 erkannt. Diese Rezeptoren können unter physiologischen Bedingungen anhand von Struktur und Modifikationen zwischen zelleigener und zellfremder RNA unterscheiden, unter pathologischen Bedingungen kann es aber auch zu einer Erkennung körpereigener RNA kommen.

Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Erkennung zelleigener RNA im Zytoplasma. Während einer Virusinfektion kann doppelsträngige virale RNA nicht nur direkt durch die RIG I ähnlichen Rezeptoren erkannt werden, sondern auch indirekt über 2'5' Oligoadenylat-aktivierte RNase L aktivieren. Dies führt zum Schneiden zelleigener RNA, wobei die gebildeten Fragmente wiederum von keimbahn-kodierten Rezeptoren erkannt werden. Diese Verstärkung des Gefahrensignals nimmt eine grundlegende Rolle in der Virusabwehr ein.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Erkennung zelleigener RNase-generierter RNA-Fragmente ausschließlich über RIG I verläuft. Die Existenz spezifischer endogener RIG I Liganden wurde belegt und die Sequenzen der betreffenden Fragmente wurden mittels Next Generation Sequencing ermittelt. Hierbei handelt es sich um Strukturen aus der 28S rRNA und der ITS2, einem Prozessierungsprodukt der 45S rRNA. Der spezifische RIG I aktivierende Effekt dieser Sequenzen konnte in verschiedenen Stimulationsexperimenten nachgewiesen werden. Interessanterweise tragen die endogenen stimulatorischen RNA-Spezies im Gegensatz zum Prototyp eines RIG I Liganden kein 5' Triphosphat, sondern ein 3' Monophosphat, auch weisen sie keine typische Basenzusammensetzung mit hohem Uridingehalt auf. Stattdessen werden die außergewöhnlich GC-reichen Sequenzen vermutlich aufgrund ihrer Doppelsträngigkeit und einer Ringstruktur nahe der Schnittstelle von RIG I erkannt. Die besondere Bedeutung dieser Sequenzen wird durch die evolutionäre Konservierung dieser Strukturen belegt, auch könnten sie nicht nur eine Funktion in der Virusabwehr, sondern auch als Tumorsuppressor haben.

Die intrazelluläre Generierung immunstimulatorischer RNA-Spezies erfolgt nicht nur über die virusinduzierte RNase L, sondern auch über eine artifiziell in die Zelle transfizierte RNase A. Dies eröffnet die Möglichkeit zur Etablierung von RNase A als neue Adjuvansspezies.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss verschiedene Modifikationen des 18S rRNA Abkömmlings RNA63 auf dessen Erkennung durch die endosomalen TLRs 7 und 8 haben. Eine nichtmodifizierte RNA63 und solche mit einer 2'-O-Deoxy- oder Fluorgruppe werden sowohl durch TLR7 als auch durch TLR8 erkannt. Durch eine 2'-O-Methylierung allerdings lässt sich die Erkennung der RNA63 durch TLR7 hemmen, nicht aber die Erkennung durch TLR8. Somit handelt es sich bei 2'-methylierter RNA63 um einen spezifischen TLR8-aktivierenden Liganden.

Schlüsselwörter: RIG I, RNase L, RNase A, 45S rRNA, ITS2, TLR8, Modifikationen

Immunorecognition of endogenous RNA ligands

Innate immunity has evolved different pattern recognition receptors to detect pathogen associated molecular patterns (PAMPs) and to elicit an immune response. Whereas double stranded RNA in the cytoplasm is detected by RIG I and MDA5, double- and single stranded RNA in the endosome is recognized by Toll like Receptors (TLRs) 3, 7 and 8. Under physiological conditions, these receptors discriminate between foreign and self RNA based on certain structures and modification patterns. Under pathological conditions, these receptors can also recognize self RNA.

The major part of this thesis deals with the detection of self RNA as a potential danger signal in the cytoplasm. In the case of viral infection, in addition to the activation of RIG I and MDA5, double stranded RNA also leads to the activation of RNase L. Subsequently, cellular RNA is digested and fragments bound to pattern recognition receptors, which results in an amplification of the danger signal.

In this thesis, it could be shown that the fragments of self-RNA are exclusively recognized by RIG I. It was proven that this RIG I activation is not a common effect of digested RNA but caused by specific RNA structures. The sequences of these molecules were obtained by Next Generation Sequencing. The endogenous RIG I ligands are derived from expansion segments in the 28S rRNA and from ITS2, a processing product of the 45S rRNA. Their specific RIG I activating effect could be shown in different immunostimulation experiments. Unlike the common model of an ultimate RIG I ligand, they do not bear a 5' triphosphate but a 3' monophosphate and are not rich in uridine but in guanosine and cytosine. Instead, the endogenous RIG I ligands seem to be detected due to their double-strandness and a certain loop structure. Involvement of ITS2 indicates a further link not only between antiviral response and RNase L but also between RNase L, rRNA biogenesis and cancer development.

Generation of immunostimulatory RNA species is not only limited to virus induced RNase L but can also be obtained by artificial transfection of RNase A into a cell. Consequently, RNase A might be established as a novel species of adjuvant.

In the second part of this thesis, the impact of modifications on the TLR7 and 8 mediated recognition of 18S rRNA derived RNA63 was analysed. Unmodified RNA63 and RNA63 bearing a 2'-O-deoxy or 2'-O-fluor modification all activate TLR7 and TLR8 while 2'-O-methylation inhibits TLR7 dependent signaling and is solely detected by TLR8. This is why TLR8 activation is more resistant to RNA-modifications than TLR7 activation. Consequently, 2'-O-methylated RNA63 is a specific TLR8 ligand.

Keywords: RIG I, RNase L, RNase A, 45S rRNA, ITS2, TLR8, modification

Literaturverzeichnis

1. Abate-Daga D, *et al.* (2014) Development of a T cell receptor targeting an HLA-A*0201 restricted epitope from the cancer-testis antigen SSX2 for adoptive immunotherapy of cancer. *PLoS One* 9(3):e93321.
2. Abdelsadik A & Trad A (2011) Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 72(12):1188-1193.
3. Ablasser A, *et al.* (2009) RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nature immunology* 10(10):1065-1072.
4. Ahmed R & Gray D (1996) Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272(5258):54-60.
5. Akira S & Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4(7):499-511.
6. Al-Ahmadi W, Al-Haj L, Al-Mohanna FA, Silverman RH, & Khabar KS (2009) RNase L downmodulation of the RNA-binding protein, HuR, and cellular growth. *Oncogene* 28(15):1782-1791.
7. Aliyari R & Ding SW (2009) RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. *Immunol Rev* 227(1):176-188.
8. Anderson BR, *et al.* (Nucleoside modifications in RNA limit activation of 2'-5'-oligoadenylate synthetase and increase resistance to cleavage by RNase L. *Nucleic Acids Res* 39(21):9329-9338.
9. Anderson KV, Bokla L, & Nusslein-Volhard C (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42(3):791-798.
10. Anger AM, *et al.* (2013) Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. *Nature* 497(7447):80-85.
11. Ardelt W, Ardelt B, & Darzynkiewicz Z (2009) Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy. *Eur J Pharmacol* 625(1-3):181-189.
12. Ardelt W, Mikulski SM, & Shogen K (1991) Amino acid sequence of an anti-tumor protein from Rana pipiens oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases. *J Biol Chem* 266(1):245-251.
13. Arimoto K, *et al.* (2007) Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(18):7500-7505.
14. Arnold U & Ulbrich-Hofmann R (2006) Natural and engineered ribonucleases as potential cancer therapeutics. *Biotechnol Lett* 28(20):1615-1622.
15. Bachellerie JP & Cavaille J (1997) Guiding ribose methylation of rRNA. *Trends Biochem Sci* 22(7):257-261.
16. Bardon A, Sierakowska H, & Shugar D (1976) Human pancreatic-type ribonucleases with activity against double-stranded ribonucleic acids. *Biochim Biophys Acta* 438(2):461-473.
17. Barton GM & Kagan JC (2009) A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol* 9(8):535-542.
18. Bauer S, Pigisch S, Hangel D, Kaufmann A, & Hamm S (2008) Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9. *Immunobiology* 213(3-4):315-328.
19. Baum A, Sachidanandam R, & Garcia-Sastre A (2010) Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(37):16303-16308.
20. Behera AK, Kumar M, Lockey RF, & Mohapatra SS (2002) 2'-5' Oligoadenylate synthetase plays a critical role in interferon-gamma inhibition of respiratory syncytial virus infection of human epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 277(28):25601-25608.
21. Bisbal C, Martinand C, Silhol M, Lebleu B, & Salehzada T (1995) Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway. *J Biol Chem* 270(22):13308-13317.

22. Bisbal C & Silverman RH (2007) Diverse functions of RNase L and implications in pathology. *Biochimie* 89(6-7):789-798.
23. Blight KJ, McKeating JA, & Rice CM (2002) Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 76(24):13001-13014.
24. Boix E & Nogues MV (2007) Mammalian antimicrobial proteins and peptides: overview on the RNase A superfamily members involved in innate host defence. *Mol Biosyst* 3(5):317-335.
25. Bonnevie-Nielsen V, et al. (2005) Variation in antiviral 2',5'-oligoadenylate synthetase (2'5'AS) enzyme activity is controlled by a single-nucleotide polymorphism at a splice-acceptor site in the OAS1 gene. *American journal of human genetics* 76(4):623-633.
26. Bowie AG & Unterholzner L (2008) Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 8(12):911-922.
27. Braasch DA, et al. (2003) RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* 42(26):7967-7975.
28. Bretscher LE, Abel RL, & Raines RT (2000) A ribonuclease A variant with low catalytic activity but high cytotoxicity. *J Biol Chem* 275(14):9893-9896.
29. Carpten J, et al. (2002) Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. *Nat Genet* 30(2):181-184.
30. Castanier C, et al. (2012) MAVS ubiquitination by the E3 ligase TRIM25 and degradation by the proteasome is involved in type I interferon production after activation of the antiviral RIG-I-like receptors. *BMC Biol* 10:44.
31. Cayley PJ, Davies JA, McCullagh KG, & Kerr IM (1984) Activation of the ppp(A2'p)nA system in interferon-treated, herpes simplex virus-infected cells and evidence for novel inhibitors of the ppp(A2'p)nA-dependent RNase. *Eur J Biochem* 143(1):165-174.
32. Chakrabarti A, Ghosh PK, Banerjee S, Gaughan C, & Silverman RH (2012) RNase L triggers autophagy in response to viral infections. *J Virol* 86(20):11311-11321.
33. Chakrabarti A, Jha BK, & Silverman RH (New insights into the role of RNase L in innate immunity. *J Interferon Cytokine Res* 31(1):49-57.
34. Chang WL, et al. (2007) Influenza virus infection causes global respiratory tract B cell response modulation via innate immune signals. *J Immunol* 178(3):1457-1467.
35. Chattopadhyay S, et al. (Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax. *Embo J* 29(10):1762-1773.
36. Chattopadhyay S, Yamashita M, Zhang Y, & Sen GC (2011) The IRF-3/Bax-mediated apoptotic pathway, activated by viral cytoplasmic RNA and DNA, inhibits virus replication. *J Virol* 85(8):3708-3716.
37. Chen C, et al. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33(20):e179.
38. Chen W, et al. (2013) Induction of Siglec-G by RNA Viruses Inhibits the Innate Immune Response by Promoting RIG-I Degradation. *Cell* 152(3):467-478.
39. Childs KS, Randall RE, & Goodbourn S (2013) LGP2 plays a critical role in sensitizing mda-5 to activation by double-stranded RNA. *PLoS One* 8(5):e64202.
40. Chiu Y-H, Macmillan JB, & Chen ZJ (2009) RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138(3):576-591.
41. Chiu YL & Rana TM (2003) siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA* 9(9):1034-1048.
42. Chomczynski P & Sacchi N (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1(2):581-585.
43. Cisterna B & Biggiogera M (2010) Ribosome biogenesis: from structure to dynamics. *Int Rev Cell Mol Biol* 284:67-111.

44. Coffman RL, Sher A, & Seder RA (2010) Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33(4):492-503.
45. Coleman AW (2003) ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends Genet* 19(7):370-375.
46. Cooper DA, Jha BK, Silverman RH, Hesselberth JR, & Barton DJ (2014) Ribonuclease L and metal-ion-independent endoribonuclease cleavage sites in host and viral RNAs. *Nucleic Acids Res* 42(8):5202-5216.
47. Csencsits KL & Bishop DK (2003) Contrasting alloreactive CD4+ and CD8+ T cells: there's more to it than MHC restriction. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 3(2):107-115.
48. Dadi S, Le Noir S, Asnafi V, Beldjord K, & Macintyre EA (2009) Normal and pathological V(D)J recombination: contribution to the understanding of human lymphoid malignancies. *Adv Exp Med Biol* 650:180-194.
49. Davis WG, et al. (The 3' untranslated regions of influenza genomic sequences are 5'PPP-independent ligands for RIG-I. *PLoS One* 7(3):e32661.
50. Decatur WA & Fournier MJ (2002) rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci* 27(7):344-351.
51. Decker T, Muller M, & Stockinger S (2005) The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol* 5(9):675-687.
52. Desai SY & Sen GC (1997) Effects of varying lengths of double-stranded RNA on binding and activation of 2'-5'-oligoadenylate synthetase. *J Interferon Cytokine Res* 17(9):531-536.
53. Diamond MS & Farzan M (2013) The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat Rev Immunol* 13(1):46-57.
54. Dickson KA, Haigis MC, & Raines RT (2005) Ribonuclease inhibitor: structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 80:349-374.
55. Diebold SS, et al. (2006) Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur J Immunol* 36(12):3256-3267.
56. Dixit E, et al. (2010) Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* 141(4):668-681.
57. Dong B & Silverman RH (1995) 2-5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2-5A. *J Biol Chem* 270(8):4133-4137.
58. Dong B, et al. (1994) Intrinsic molecular activities of the interferon-induced 2-5A-dependent RNase. *J Biol Chem* 269(19):14153-14158.
59. Drider D & Condon C (2004) The continuing story of endoribonuclease III. *J Mol Microbiol Biotechnol* 8(4):195-200.
60. Drygin D, Rice WG, & Grummt I (2010) The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:131-156.
61. Dundr M & Olson MO (1998) Partially processed pre-rRNA is preserved in association with processing components in nucleolus-derived foci during mitosis. *Mol Biol Cell* 9(9):2407-2422.
62. Dustin ML (2014) What Counts in the Immunological Synapse? *Mol Cell* 54(2):255-262.
63. Eberle F, et al. (2008) Modifications in small interfering RNA that separate immunostimulation from RNA interference. *J Immunol* 180(5):3229-3237.
64. F W (2008) Innate Immunity. . in *Desk Encyclopedia of General Virology*, ed Marc H.V. van Regenmortel BWJM.
65. Fabbri M, et al. (2012) MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(31):E2110-2116.
66. Flanagan JB, Petterson RF, Ambros V, Hewlett NJ, & Baltimore D (1977) Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proceedings*

- of the *National Academy of Sciences of the United States of America* 74(3):961-965.
67. Floyd-Smith G, Slattery E, & Lengyel P (1981) Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'-5')oligoadenylate--dependent endonuclease. *Science* 212(4498):1030-1032.
68. Friedman CS, *et al.* (2008) The tumour suppressor CYLD is a negative regulator of RIG-I-mediated antiviral response. *EMBO Rep* 9(9):930-936.
69. Gack MU, *et al.* (2009) Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe* 5(5):439-449.
70. Gack MU, *et al.* (2008) Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(43):16743-16748.
71. Gack MU, *et al.* (2007) TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446(7138):916-920.
72. Gao D, *et al.* (2009) REUL is a novel E3 ubiquitin ligase and stimulator of retinoic-acid-inducible gene-I. *PloS one* 4(6):e5760.
73. Gazzinelli RT, Mendonca-Neto R, Lilue J, Howard J, & Sher A (2014) Innate Resistance against *Toxoplasma gondii*: An Evolutionary Tale of Mice, Cats, and Men. *Cell Host Microbe* 15(2):132-138.
74. Gorden KB, *et al.* (2005) Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol* 174(3):1259-1268.
75. Gorden KK, *et al.* (2006) Oligodeoxynucleotides differentially modulate activation of TLR7 and TLR8 by imidazoquinolines. *J Immunol* 177(11):8164-8170.
76. Gorden KK, Qiu XX, Binsfeld CC, Vasilakos JP, & Alkan SS (2006) Cutting edge: activation of murine TLR8 by a combination of imidazoquinoline immune response modifiers and polyT oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 177(10):6584-6587.
77. Gordon S (2002) Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111(7):927-930.
78. Goutagny N, Estornes Y, Hasan U, Lebecque S, & Caux C (2012) Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy. *Targeted oncology* 7(1):29-54.
79. Guo X, *et al.* (2012) Identification of OASL d, a splice variant of human OASL, with antiviral activity. *Int J Biochem Cell Biol* 44(7):1133-1138.
80. Habjan M, *et al.* (2008) Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS One* 3(4):e2032.
81. Hafner M, *et al.* (2008) Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. *Methods* 44(1):3-12.
82. Haigis MC, Kurten EL, & Raines RT (2003) Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry. *Nucleic Acids Res* 31(3):1024-1032.
83. Hamm S, *et al.* (2007) Immunostimulatory RNA is a potent inducer of antigen-specific cytotoxic and humoral immune response in vivo. *Int Immunol* 19(3):297-304.
84. Hamm S, *et al.* (2009) Alternating 2'-O-ribose methylation is a universal approach for generating non-stimulatory siRNA by acting as TLR7 antagonist. *Immunobiology*.
85. Han JQ & Barton DJ (2002) Activation and evasion of the antiviral 2'-5' oligoadenylate synthetase/ribonuclease L pathway by hepatitis C virus mRNA. *RNA* 8(4):512-525.
86. Hancock JM & Dover GA (1988) Molecular coevolution among cryptically simple expansion segments of eukaryotic 26S/28S rRNAs. *Mol Biol Evol* 5(4):377-391.
87. Hannan KM, Hannan RD, & Rothblum LI (1998) Transcription by RNA polymerase I. *Front Biosci* 3:d376-398.

88. Hannan KM, *et al.* (2000) RNA polymerase I transcription in confluent cells: Rb downregulates rDNA transcription during confluence-induced cell cycle arrest. *Oncogene* 19(31):3487-3497.
89. Hartmann R, Olsen HS, Widder S, Jorgensen R, & Justesen J (1998) p59OASL, a 2'-5' oligoadenylate synthetase like protein: a novel human gene related to the 2'-5' oligoadenylate synthetase family. *Nucleic Acids Res* 26(18):4121-4128.
90. Heil F, *et al.* (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303(5663):1526-1529.
91. Hemdan NY, *et al.* (2005) Dose-dependent modulation of the in vitro cytokine production of human immune competent cells by lead salts. *Toxicol Sci* 86(1):75-83.
92. Hersh CL, *et al.* (1984) Simian virus 40-infected, interferon-treated cells contain 2',5'-oligoadenylates which do not activate cleavage of RNA. *J Biol Chem* 259(3):1731-1737.
93. Hornung V, *et al.* (2006) 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314(5801):994-997.
94. Hornung V, *et al.* (2005) Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11(3):263-270.
95. Hornung V, *et al.* (2002) Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168(9):4531-4537.
96. Hou F, *et al.* (MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* 146(3):448-461.
97. Hou J, *et al.* (2014) Hepatic RIG-I predicts survival and interferon- α therapeutic response in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 25(1):49-63.
98. Hwang SY, *et al.* (2011) 5'-Triphosphate-RNA-independent activation of RIG-I via RNA aptamer with enhanced antiviral activity. *Nucleic Acids Res*.
99. Ivashkiv LB & Donlin LT (2014) Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14(1):36-49.
100. Jensen PE (1999) Mechanisms of antigen presentation. *Clin Chem Lab Med* 37(3):179-186.
101. Jiang X, *et al.* (2012) Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response. *Immunity* 36(6):959-973.
102. Jin MS & Lee JO (2008) Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* 29(2):182-191.
103. Jockel S, *et al.* (2012) The 2'-O-methylation status of a single guanosine controls transfer RNA-mediated Toll-like receptor 7 activation or inhibition. *J Exp Med* 209(2):235-241.
104. Joseph N, Krauskopf E, Vera MI, & Michot B (1999) Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. *Nucleic Acids Res* 27(23):4533-4540.
105. Jung S (2009) Untersuchungen zur Oligomerisierung des Ebola-Virus Matrixproteins VP40. Diploma (Philipps-University Marburg, Marburg).
106. Jurk M, *et al.* (2002) Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 3(6):499.
107. Kang DC, *et al.* (2004) Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. *Oncogene* 23(9):1789-1800.
108. Kariko K, Buckstein M, Ni H, & Weissman D (2005) Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 23(2):165-175.
109. Kato H, *et al.* (2005) Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23(1):19-28.

110. Kato H, *et al.* (2008) Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* 205(7):1601-1610.
111. Kato H, *et al.* (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441(7089):101-105.
112. Kato T, *et al.* (2006) Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat Protoc* 1(5):2334-2339.
113. Kenneth Morphy PT, Mark Walport (2008) *Janeway's immuno biology* (Garland Science) seventh edition Ed p 887.
114. Kim HS, Byun SH, & Lee BM (2005) Effects of chemical carcinogens and physicochemical factors on the UV spectrophotometric determination of DNA. *J Toxicol Environ Health A* 68(23-24):2081-2095.
115. Koch U & Radtke F (2011) Mechanisms of T cell development and transformation. *Annual review of cell and developmental biology* 27:539-562.
116. Koff WC, *et al.* (2013) Accelerating next-generation vaccine development for global disease prevention. *Science* 340(6136):1232910.
117. Kolakofsky D, Kowalinski E, & Cusack S (2012) A structure-based model of RIG-I activation. *RNA* 18(12):2118-2127.
118. Komuro A & Horvath CM (2006) RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *J Virol* 80(24):12332-12342.
119. Krocova Z, Macela A, Kroca M, & Hernychova L (2000) The immunomodulatory effect(s) of lead and cadmium on the cells of immune system in vitro. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 14(1):33-40.
120. Kubota K, *et al.* (2004) Identification of 2'-phosphodiesterase, which plays a role in the 2-5A system regulated by interferon. *J Biol Chem* 279(36):37832-37841.
121. Kumar H, Kawai T, & Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30(1):16-34.
122. Laity JH, Shimotakahara S, & Scheraga HA (1993) Expression of wild-type and mutant bovine pancreatic ribonuclease A in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(2):615-619.
123. Lazdins IB, Delannoy M, & Sollner-Webb B (1997) Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization. *Chromosoma* 105(7-8):481-495.
124. Lee SM, *et al.* (2014) Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(10):3793-3798.
125. Li K, Chen Z, Kato N, Gale M, Jr., & Lemon SM (2005) Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes. *J Biol Chem* 280(17):16739-16747.
126. Li K, *et al.* (2012) Activation of chemokine and inflammatory cytokine response in hepatitis C virus-infected hepatocytes depends on Toll-like receptor 3 sensing of hepatitis C virus double-stranded RNA intermediates. *Hepatology* 55(3):666-675.
127. Li W (2011) On parameters of the human genome. *Journal of theoretical biology* 288:92-104.
128. Li X, Leung S, Kerr IM, & Stark GR (1997) Functional subdomains of STAT2 required for preassociation with the alpha interferon receptor and for signaling. *Mol Cell Biol* 17(4):2048-2056.
129. Li X, Leung S, Qureshi S, Darnell JE, Jr., & Stark GR (1996) Formation of STAT1-STAT2 heterodimers and their role in the activation of IRF-1 gene transcription by interferon-alpha. *J Biol Chem* 271(10):5790-5794.
130. Li Y & Shi X (2013) MicroRNAs in the regulation of TLR and RIG-I pathways. *Cell Mol Immunol* 10(1):65-71.
131. Liang SL, Quirk D, & Zhou A (2006) RNase L: its biological roles and regulation. *IUBMB life* 58(9):508-514.

132. Loo YM & Gale M, Jr. (2011) Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34(5):680-692.
133. Luhtala N & Parker R (2010) T2 Family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles. *Trends Biochem Sci* 35(5):253-259.
134. Luthra P, Sun D, Silverman RH, & He B (2011) Activation of IFN- γ expression by a viral mRNA through RNase L and MDA5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(5):2118-2123.
135. Ma D, Wei Y, & Liu F (2013) Regulatory mechanisms of thymus and T cell development. *Dev Comp Immunol* 39(1-2):91-102.
136. Maden BE (1990) The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 39:241-303.
137. Maden BE & Hughes JM (1997) Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem. *Chromosoma* 105(7-8):391-400.
138. Maitra RK, *et al.* (1994) HIV-1 TAR RNA has an intrinsic ability to activate interferon-inducible enzymes. *Virology* 204(2):823-827.
139. Malathi K, Dong B, Gale M, Jr., & Silverman RH (2007) Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* 448(7155):816-819.
140. Malathi K, *et al.* (2010) RNase L releases a small RNA from HCV RNA that refolds into a potent PAMP. *RNA* 16(11):2108-2119.
141. Marie I, Durbin JE, & Levy DE (1998) Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *The EMBO journal* 17(22):6660-6669.
142. Marie I, Svab J, & Hovanessian AG (1990) The binding of the 69- and 100-kD forms of 2',5'-oligoadenylate synthetase to different polynucleotides. *J Interferon Res* 10(6):571-578.
143. Marques JT, *et al.* (2006) A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 24(5):559-565.
144. Martinand C, *et al.* (1999) RNase L inhibitor is induced during human immunodeficiency virus type 1 infection and down regulates the 2-5A/RNase L pathway in human T cells. *Journal of virology* 73(1):290-296.
145. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, & Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388(6640):394-397.
146. Mibayashi M, *et al.* (2007) Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *Journal of virology* 81(2):514-524.
147. Min JY & Krug RM (2006) The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(18):7100-7105.
148. Mix E, Goertsches R, & Zett UK (2006) Immunoglobulins--basic considerations. *Journal of neurology* 253 Suppl 5:V9-17.
149. Morrissey JP & Tollervy D (1995) Birth of the snoRNPs: the evolution of RNase MRP and the eukaryotic pre-rRNA-processing system. *Trends Biochem Sci* 20(2):78-82.
150. Mukherjee A, *et al.* (2009) Retinoic acid-induced gene-1 (RIG-I) associates with the actin cytoskeleton via caspase activation and recruitment domain-dependent interactions. *J Biol Chem* 284(10):6486-6494.
151. Mullineux ST & Lafontaine DL (2012) Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand? *Biochimie* 94(7):1521-1532.
152. Nokes BT, *et al.* (2013) In Vitro Assessment of the Inflammatory Breast Cancer Cell Line SUM 149: Discovery of 2 Single Nucleotide Polymorphisms in the RNase L Gene. *J Cancer* 4(2):104-116.
153. Oldenburg M, *et al.* (2012) TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science* 337(6098):1111-1115.

154. Oshiumi H, Matsumoto M, Hatakeyama S, & Seya T (2009) Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *J Biol Chem* 284(2):807-817.
155. Oshiumi H, et al. (2010) The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell host & microbe* 8(6):496-509.
156. Osterloh A & Breloer M (2008) Heat shock proteins: linking danger and pathogen recognition. *Med Microbiol Immunol* 197(1):1-8.
157. Pabst R (2007) Plasticity and heterogeneity of lymphoid organs. What are the criteria to call a lymphoid organ primary, secondary or tertiary? *Immunol Lett* 112(1):1-8.
158. Paz S, et al. (2006) Induction of IRF-3 and IRF-7 phosphorylation following activation of the RIG-I pathway. *Cellular and molecular biology* 52(1):17-28.
159. Peisley A, et al. (2012) Kinetic mechanism for viral dsRNA length discrimination by MDA5 filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(49):E3340-3349.
160. Peisley A, et al. (2011) Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(52):21010-21015.
161. Peters K, Chattopadhyay S, & Sen GC (2008) IRF-3 activation by Sendai virus infection is required for cellular apoptosis and avoidance of persistence. *Journal of virology* 82(7):3500-3508.
162. Pichlmair A, et al. (2009) Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J Virol* 83(20):10761-10769.
163. Plumet S, et al. (2007) Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response. *PLoS One* 2(3):e279.
164. Poeck H, et al. (2010) Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nat Immunol* 11(1):63-69.
165. Pollpeter D, Komuro A, Barber GN, & Horvath CM (2011) Impaired Cellular Responses to Cytosolic DNA or Infection with *Listeria monocytogenes* and Vaccinia Virus in the Absence of the Murine LGP2 Protein. *PLoS One* 6(4):e18842.
166. Probst J, et al. (2006) Characterization of the ribonuclease activity on the skin surface. *Genet Vaccines Ther* 4:4.
167. Raines RT (1998) Ribonuclease A. *Chem Rev* 98(3):1045-1066.
168. Ramos HJ & Gale M, Jr. (2011) RIG-I like receptors and their signaling crosstalk in the regulation of antiviral immunity. *Curr Opin Virol* 1(3):167-176.
169. Ranji A & Boris-Lawrie K (2010) RNA helicases: emerging roles in viral replication and the host innate response. *RNA biology* 7(6):775-787.
170. Rebouillat D & Hovanessian AG (1999) The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res* 19(4):295-308.
171. Rebouillat D, Marie I, & Hovanessian AG (1998) Molecular cloning and characterization of two related and interferon-induced 56-kDa and 30-kDa proteins highly similar to 2'-5' oligoadenylate synthetase. *European journal of biochemistry / FEBS* 257(2):319-330.
172. Reed SG, Orr MT, & Fox CB (2013) Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med* 19(12):1597-1608.
173. Regan T, et al. (2013) Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages. *J Immunol* 191(12):6084-6092.
174. Rehwinkel J & Reis e Sousa C (2010) RIGorous detection: exposing virus through RNA sensing. *Science* 327(5963):284-286.
175. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, & Bazan JF (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(2):588-593.

176. Roos A, *et al.* (2004) Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. *Eur J Immunol* 34(4):921-929.
177. Rosenberg HF (2008) RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story. *J Leukoc Biol* 83(5):1079-1087.
178. Rutkoski TJ & Raines RT (2008) Evasion of ribonuclease inhibitor as a determinant of ribonuclease cytotoxicity. *Current pharmaceutical biotechnology* 9(3):185-189.
179. Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, & Gale M, Jr. (2008) Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 454(7203):523-527.
180. Samanta M, Iwakiri D, Kanda T, Imaizumi T, & Takada K (2006) EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *The EMBO journal* 25(18):4207-4214.
181. Sanchez R & Mohr I (2007) Inhibition of cellular 2'-5' oligoadenylate synthetase by the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. *J Virol* 81(7):3455-3464.
182. Sato M, *et al.* (1998) Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett* 441(1):106-110.
183. Satoh T, *et al.* (2010) LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(4):1512-1517.
184. Schirrmann T, Krauss J, Arndt MA, Rybak SM, & Dubel S (2009) Targeted therapeutic RNases (ImmunoRNases). *Expert Opin Biol Ther* 9(1):79-95.
185. Schlee M, *et al.* (2009) Approaching the RNA ligand for RIG-I? *Immunol Rev* 227(1):66-74.
186. Schlee M & Hartmann G (The chase for the RIG-I ligand--recent advances. *Mol Ther* 18(7):1254-1262.
187. Schlee M, *et al.* (2009) Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 31(1):25-34.
188. Schmidt A, *et al.* (2009) 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(29):12067-12072.
189. Schnell G, Loo YM, Marcotrigiano J, & Gale M, Jr. (Uridine Composition of the Poly-U/UC Tract of HCV RNA Defines Non-Self Recognition by RIG-I. *PLoS Pathog* 8(8):e1002839.
190. Schoggins JW & Rice CM (2011) Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* 1(6):519-525.
191. Schoggins JW, *et al.* (2011) A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472(7344):481-485.
192. Schultz J, Maisel S, Gerlach D, Muller T, & Wolf M (2005) A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *RNA* 11(4):361-364.
193. Seth RB, Sun L, Ea C-K, & Chen ZJ (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122(5):669-682.
194. Shishova KV, Zharskaya CO, & Zatsepina CO (2011) The Fate of the Nucleolus during Mitosis: Comparative Analysis of Localization of Some Forms of Pre-rRNA by Fluorescent in Situ Hybridization in NIH/3T3 Mouse Fibroblasts. *Acta naturae* 3(4):100-106.
195. Siddiqui MA & Malathi K (2012) RNase L induces autophagy via c-Jun N-terminal kinase and double-stranded RNA-dependent protein kinase signaling pathways. *J Biol Chem* 287(52):43651-43664.
196. Silverman RH (2007) Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J Virol* 81(23):12720-12729.
197. Silverman RH, Skehel JJ, James TC, Wreschner DH, & Kerr IM (1983) rRNA cleavage as an index of ppp(A2'p)nA activity in interferon-treated encephalomyocarditis virus-infected cells. *Journal of virology* 46(3):1051-1055.

198. Sollner-Webb B & Tower J (1986) Transcription of cloned eukaryotic ribosomal RNA genes. *Annu Rev Biochem* 55:801-830.
199. Sorrentino S (1998) Human extracellular ribonucleases: multiplicity, molecular diversity and catalytic properties of the major RNase types. *Cell Mol Life Sci* 54(8):785-794.
200. Sumpter R, Jr., et al. (2005) Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 79(5):2689-2699.
201. Susanne Modrow DF, Uwe Truyen (2003) *Molekulare Virologie*.
202. Takahasi K, et al. (2008) Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell* 29(4):428-440.
203. Tanaka N, et al. (2004) Structural basis for recognition of 2',5'-linked oligoadenylates by human ribonuclease L. *EMBO J* 23(20):3929-3938.
204. Tang F, Du Q, & Liu YJ (2010) Plasmacytoid dendritic cells in antiviral immunity and autoimmunity. *Science China. Life sciences* 53(2):172-182.
205. Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, & Fitzgerald KA (2011) Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* 3(6):920-940.
206. Tluk S, et al. (2009) Sequences derived from self-RNA containing certain natural modifications act as suppressors of RNA-mediated inflammatory immune responses. *Int Immunol* 21(5):607-619.
207. Trautwein K, Holliger P, Stackhouse J, & Benner SA (1991) Site-directed mutagenesis of bovine pancreatic ribonuclease: lysine-41 and aspartate-121. *FEBS Lett* 281(1-2):275-277.
208. Trinchieri G (2010) Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* 207(10):2053-2063.
209. Tschochner H & Hurt E (2003) Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* 13(5):255-263.
210. Uehata T & Akira S (2013) mRNA degradation by the endoribonuclease Regnase-1/ZC3H12a/MCPIP-1. *Biochim Biophys Acta* 1829(6-7):708-713.
211. Uzri D & Gehrke L (2009) Nucleotide sequences and modifications that determine RIG-I/RNA binding and signaling activities. *J Virol* 83(9):4174-4184.
212. Venkataraman T, et al. (2007) Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol* 178(10):6444-6455.
213. Volkin E & Cohn WE (1953) On the structure of ribonucleic acids. II. The products of ribonuclease action. *J Biol Chem* 205(2):767-782.
214. von Landenberg P & Bauer S (2007) Nucleic acid recognizing Toll-like receptors and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 19(6):606-610.
215. Weber M, et al. (2013) Incoming RNA virus nucleocapsids containing a 5'-triphosphorylated genome activate RIG-I and antiviral signaling. *Cell Host Microbe* 13(3):336-346.
216. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, & Diederichs S (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11(3):228-234.
217. Wreschner DH, James TC, Silverman RH, & Kerr IM (1981) Ribosomal RNA cleavage, nuclease activation and 2-5A(ppp(A2'p)nA) in interferon-treated cells. *Nucleic Acids Res* 9(7):1571-1581.
218. Wreschner DH, McCauley JW, Skehel JJ, & Kerr IM (1981) Interferon action--sequence specificity of the ppp(A2'p)nA-dependent ribonuclease. *Nature* 289(5796):414-417.
219. Wu B, et al. (2013) Structural Basis for dsRNA Recognition, Filament Formation, and Antiviral Signal Activation by MDA5. *Cell* 152(1-2):276-289.
220. Wu H, Xu H, Miraglia LJ, & Crooke ST (2000) Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *The Journal of biological chemistry* 275(47):36957-36965.

221. Yoneyama M, *et al.* (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology* 5(7):730-737.
222. Yoneyama M, Onomoto K, & Fujita T (2008) Cytoplasmic recognition of RNA. *Adv Drug Deliv Rev* 60(7):841-846.
223. Yu P, *et al.* (2012) Nucleic acid-sensing Toll-like receptors are essential for the control of endogenous retrovirus viremia and ERV-induced tumors. *Immunity* 37(5):867-879.
224. Yu YT, Shu MD, & Steitz JA (1997) A new method for detecting sites of 2'-O-methylation in RNA molecules. *RNA* 3(3):324-331.
225. Zemirli N & Arnoult D (2012) Mitochondrial anti-viral immunity. *Int J Biochem Cell Biol* 44(9):1473-1476.
226. Zhao L, *et al.* (2012) Antagonism of the interferon-induced OAS-RNase L pathway by murine coronavirus ns2 protein is required for virus replication and liver pathology. *Cell Host Microbe* 11(6):607-616.
227. Zhou A, Hassel BA, & Silverman RH (1993) Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell* 72(5):753-765.
228. Zhou A, *et al.* (1997) Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *EMBO J* 16(21):6355-6363.
229. Zhu S, Pan W, & Qian Y (2013) MicroRNA in immunity and autoimmunity. *Journal of molecular medicine* 91(9):1039-1050.
230. Zou J, Chang M, Nie P, & Secombes CJ (2009) Origin and evolution of the RIG-I like RNA helicase gene family. *BMC Evol Biol* 9:85.
231. Zust R, *et al.* (Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat Immunol* 12(2):137-143.

Abkürzungsverzeichnis

2'-PDE	2' Phosphodiesterase
2-5 A	2'5' Oligoadenylat
3'p	3' Monophosphat
5'OH	5' Hydroxygruppe
5'p	5' Monophosphat
5'ppp	5' Triphosphat
A	Adenin
ADAR	Adenosine Deaminase Acting on RNA
Ala	Alanin
APCs	Antigen Presenting Cells
APC	Allophycocyanin
A/PR/8	Influenza – Virus A Puerto Rico
AS	Aminosäure
ASC	Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
Bax	Bcl-2-associated X protein
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninic Acid
C	Cytosin
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
cDCs	conventionell dendritic cells

CIP	Calf Intestine Phosphatase
C-Terminus	Carboxyterminus
CTD	Carboxy-terminale Domäne
CYLD	Cylindromatosis
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	double stranded
DTT	Dithiothreitol
dNTPs	Deoxyribonukleotide
ECMV	Encephalomyocarditis Virus
ECP	Eosinophil Cationic Protein
EDN	Eosinophil Derived Neurotoxin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
eRL	endogener RIG I Ligand
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
G	Guanin
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
HBS	Hepes buffered Saline

HCV	Hepatitis C Virus
His	Histidin
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HPC1	Hereditary prostate cancer 1
HRP	Horseradish Peroxidase
HSV	Herpes Simplex Virus
I	Inosin
i.d.R	in der Regel
IFN	Interferon
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
IRF	Interferon Regulatory Factor
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LGP2	Laboratory of Genetics and Physiology 2
Lys	Lysin
MDA5	Melanoma Differentiation-Associated Antigen 5
MHC	Major Histocompatibility Complex
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N	Nukleotid (A, C, G, T, U)
NaCl	Natriumchlorid
NDF	Nucleolus-derived Foci
NS1	Nichtstrukturprotein 1

nt	Nukleotid
N-Terminus	Aminoterminus
OAS	Oligoadenylate-Synthetase
OASL	OAS like protein
OH	Hydroxy
OPD	O-Phenylenediamine Dihydrochloride
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PARP	Poly(ADP-ribose) Polymerase
PBS _{def}	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pDCs	plasmacytoid dendritic cells
PE	Phycoerythrin
PIV5	Parainfluenzavirus 5
PKR	Proteinkinase R
PNK	Polynukletid-Kinase
p.s.	post stimulation
p.t.	post transfection
RD	regulatorische Domäne
RI	Ribonuklease Inhibitor
RIG-I	Retinoic Acid Inducible Gene I
RIPLET	Ubiquitin-Ligase RING finger protein leading to RIG I activation
RLI	RNase L Inhibitor
Rpl13	60S Ribosomal Protein L13
RLR	RIG I like receptor
RNAi	RNA-Interferenz

RNF125	Homo Sapiens Ring-Finger Protein 125
RNP	Ribonukleinpartikel
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
Pol III	RNA-Polymerase III
siRNA	short interfering RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
SSC	Side Scatter
ssRNA	single stranded RNA
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
TBS	Tris Buffered Saline
TdT	Terminalen Deoxynucleotidyl Transferase
TEACl	Tetraethylammonium Chlorid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll – like Rezeptoren
TRIM25	Tripartite motif-containing protein 25
TYK	Tyrosinkinase
U	Uracil
Us11	Unique Short 11 Protein
UTR	Untranslated Region
Viperin	Virus Inhibitory Protein, Endoplasmatic Reticulum-Associated, IFN Inducible
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus

wt

Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundstruktur der RLRs.	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung der RLR Signalgebung.	10
Abbildung 3: 5' ppp-Oligoadenylat (modifiziert aus (22)).	17
Abbildung 4: Aktivierung und Primärstruktur der RNase L.	18
Abbildung 5: Schematische Darstellung des 2-5 A / RNase L Systems.....	20
Abbildung 6: Prozessierung der 45S rRNA.	23
Abbildung 7: Funktionsweise der stem-loop PCR.	60
Abbildung 8: Funktionsweise der Klonierung durch Adapterligation nach Hafner.	62
Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Ficollgradienten.	67
Abbildung 10: ssRNase-Verdau generiert immunstimulatorische Fragmente.....	83
Abbildung 11: Optimierung der RNase A-Konzentration.	84
Abbildung 12: Unspezifische Fragmentierung von RNA.	85
Abbildung 13: Verdau mit ds-spezifischer RNase III führt nicht zur Immunstimulation.	87
Abbildung 14: Verhinderung einer immunstimulatorischen Aktivität durch RNase A/III Doppelverdau.	88
Abbildung 15: PAA-Gelelektrophorese RNase-verdauter RNA.	89
Abbildung 16: Schnittstellen in der Helix 44.	91
Abbildung 17: Quantifizierung von 44mer und Gegenstrang mittels stem-loop qRT- PCR.....	91
Abbildung 18: Identifikation des 44mers als nichtstimulatorische prominente Bande. .	93
Abbildung 19: RNase A Verdau führt zu einem speziesspezifischen Bandenmuster mit variabler stimulatorischer Aktivität.....	94
Abbildung 20: Stimulatorische Eigenschaften zellulärer RNA werden durch die Gegenwart von 45S rRNA-Prozessierungsintermediaten beeinflusst.....	96
Abbildung 21: Produkte eines RNase A-Verdaus stimulieren über RLRs, nicht über TLRs.....	97
Abbildung 22: Knockdown-Studien identifizieren die immunstimulatorischen Produkte eines RNase A-Verdaus als RIG I Ligand.	98
Abbildung 23: Verifikation des RNase A-Verdaus als RIG I Ligand.....	99
Abbildung 24: Gelextraktionen identifizieren längere RNA-Fragmente als stimulatorische Komponente.....	100
Abbildung 25: Nucleobond-Säulen basierte Aufreinigung identifiziert Bande 1 als stimulatorische Komponente.....	101
Abbildung 26: Kontrollen der Ion Torrent Proben.	102
Abbildung 27: Strukturanalyse der potentiellen endogenen RIG I Liganden.....	106
Abbildung 28: Urea-PAA-Gel der synthetisierten RNA-Oligos.....	107
Abbildung 29: Kontrolle der IVTs im Bioanalyzer.	108
Abbildung 30: ITS2- und 28s-Fragment stimulieren via RLRs.	109
Abbildung 31: ITS2- und 28s-Fragment stimulieren via RIG I.....	110
Abbildung 32:Strukturanalyse der verschiedenen ITS2-Konstrukte.....	112
Abbildung 33: Die ITS2-vermittelte Immunstimulation hängt von der Fragmentlänge ab.	113
Abbildung 34: RNase A Produktion und Transfektion.....	115
Abbildung 35: Auswirkungen verschiedener RNase A-Mutationen.....	117
Abbildung 36: PBMC-Stimulation mit RNA aus RNase A-transfizierten HEK-Zellen..	118
Abbildung 37: Nukleosid HPLC-Analyse verschiedener RNA63-Derivate	120
Abbildung 38: Zytokinfreisetzung aus humanen PBMCs nach RNA63 Stimulation. ..	121
Abbildung 39: Zytokinfreisetzung aus murinen pDCs nach RNA63 Stimulation.....	122
Abbildung 40: Reporteraktivität in HEK-Zellen nach RNA63 Stimulation.....	123
Abbildung 41: IL-8 Freisetzung aus HEK-Blue™ TLR8 Zellen nach RNA63-Stimulation.	124
Abbildung 42: Position der eRLs in der 45S rRNA.	127
Abbildung 43: Die 45S rRNA Fragmente ITS2 7219-7290 und 28S rRNA 8690-8751 sind komplementär.	130

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Virus-vermittelte Hemmung der RIG I Signalgebung.	14
Tabelle 2: Lokalisation und Liganden der TLRs (2, 73, 121, 124, 153, 173).	16
Tabelle 3: Virale Hemmung des 2' 5' Oligoadenylat-Synthetase / RNase L Weges. ...	20
Tabelle 4: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele.	47
Tabelle 5: Waschschrte der NucleoBond-Säulen.	59
Tabelle 6: Mediumanforderungen der verwendeten Zelllinien.	64
Tabelle 7: Rezeptorspezifität der Kontrollstimuli.	69
Tabelle 8: Stimulationsbedingungen verschiedener Zelllinien in einer Lipofectamin2000-Stimulation.	69
Tabelle 9: Stimulationsbedingungen verschiedener Zelllinien in einer Dotap- Stimulation.	70
Tabelle 10: murine Zytokin-ELISA.	74
Tabelle 11: humane Zytokin-ELISA.	75
Tabelle 12: FACS-Antikörper	76
Tabelle 13: Zusammensetzung der SDS-Gele.	78
Tabelle 14: Liste der verwendeten Erstantikörper.	80
Tabelle 15: Zusammensetzung der Zymogramme.	81
Tabelle 16: Sequenzierung des RNase A-Verdaus nach Tuschl.	90
Tabelle 17: Sequenzen aus dem NGS (Ion Torrent).	104
Tabelle 18: Sequenzierung der RNase A-generierten Produkte aus der ITS2-IVT (7143-7500).	112

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren der Philipps-Universität Marburg:

Adamkiewicz, Aigner, Bastians, Bauer, Baranowski, Becker, Boekhoff, Brehm, Bröring, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, Del Rey, Dietrich, Eckhardt, Eilers, Elsässer, Feuser, Garn, Garten, Glorius, Grzeschik, Hasilik, Hassel, Homberg, Huber, Jakob, Jungclas, Kaufmann, Kira, Kirchner, Knöller, Koolmann, Krebber, Lang, Lill, Liss, Luers, Maisner, Müller, Müller-Brüsselbach, Nau, Oliver, Petz, Plant, Preisig-Müller, Röhm, Röper, Schäfer, Schulz, Schütz, Schwarz, Seitz, Suske, Voigt, Weihe, Westermann, Yu

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Bauer dafür danken, dass er mir das Thema meiner Doktorarbeit bereitstellte und ich diese im Institut für Immunologie durchführen durfte. Ihm und Dr. Andreas Kaufmann danke ich für die optimale Betreuung meiner Arbeit. Ich habe mich nie alleine gelassen gefühlt, selbst wenn meine Projekte hoffnungslos in einer Sackgasse zu enden schienen, da beide schnell und unkompliziert erreichbar waren und mir mit neuen Ideen weiterhalfen. Durch regelmäßige Besprechungen und wissenschaftliche Diskussionen konnte ich viel von dem Wissen und der Erfahrung meiner Betreuer profitieren. Auch hat es mich sehr motiviert, dass ich immer meine eigenen Ideen und Lösungsvorschläge einbringen und selbstständig verwirklichen durfte. Danke Andreas, für die vielen guten Gespräche und Ratschläge, auch über die Wissenschaft hinaus.

Allen Mitarbeitern im Institut möchte ich für die freundliche Atmosphäre danken – es macht wirklich Spaß, mit euch zusammen zu arbeiten! Vielen Dank an alle, die mir geholfen haben, wenn ich mal wieder nicht genug Hände hatte oder nicht an zwei Orten gleichzeitig erscheinen konnte. Ganz besonders ist in diesem Zusammenhang natürlich Vicky zu erwähnen, ebenso wie Hannah, Steffi Jöckel, Sandra, Andreas und alle anderen Mitarbeiter der AG Kaufmann. Jenny möchte ich vor allem für meine Einarbeitung am Durchfluss-zytometer und mit den Mäusen danken. Danke Gundi, für die ganzen Bestellungen, die du so häufig für mich aufgegeben hast! Danke, Gernot, für deine große Hilfsbereitschaft, wenn ich mich mal wieder mit einem uralten Betriebssystem nicht auskannte.

Danke an alle, die mir Mäuse aus dem Tierstall mitgebracht haben: Sonja, Lisa, Henriette und Steffi Beil. Meiner Masterstudentin Elham Nasiri danke ich für die Aufreinigung einiger RNase A-Mutanten. Vielen Dank an Marion, die jeden Neuling so herzlich in Empfang nimmt und uns allen den Rücken frei von Papierkram hält. Danke an Dr. Stefan Baumeister für die MALDI-TOF Analyse der rekombinanten RNase A.

Außerhalb der Uni möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester dafür danken, dass sie mir jederzeit und in allen schwierigen Situationen im Rahmen meiner Doktorarbeit und darüber hinaus bedingungslos zur Seite stehen.

Zu guter Letzt danke ich der Studienstiftung des Deutschen Volkes für die finanzielle und ideelle Förderung während meines Studiums und meiner Doktorarbeit.